

Suche nach pflanzlichen Thrombininhibitoren - Gerbstoffe und Fettsäuren im Fokus

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christian Rack

aus Reutlingen

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 7.12.2005 angenommen.

Erstgutachter: Professor Dr. R. Matusch
Zweitgutachter: Professor Dr. W. Hanefeld

Tag der mündlichen Prüfung: 7.12.2005

Die vorliegende Arbeit entstand am Fachbereich Pharmazie im Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Rudolf Matusch

Für das interessante Themengebiet, seine stets großzügige Unterstützung, die Vermittlung seines analytischen Wissens sowie die Aufnahme in seinen Arbeitskreis möchte ich ihm an dieser Stelle sehr herzlich danken.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei:

- Dr. Daniel Rauh für die Einführung in das amidolytische Testsystem einschließlich der Bedienung des Platereaders
- Dr. Jörg Stürzebecher für die Überlassung des Testprotokolls sowie diverser Inhibitoren
- Dr. Hartmut Landgrebe und der Firma Aventis Behring für die Spende des Beriplasts
- Herrn Floris van Elsäcker für die Einarbeitung in die Methoden, seine Hilfe in diversen Projekten und die Aufnahme der Massenspektren
- Meinen Kollegen und ehemaligen Kollegen Dr. Oliver Wachsmuth, Dr. Susanne Hoßfeld, Herrn Khaled Shannoon, Dr. Sascha Illgner, Dr. Sonja Schleich, Frau Konstanze An und Frau Daniela Heller für ihre Unterstützung, die Einarbeitung in die Methoden sowie für ihre Hilfe in fachlichen Fragen
- Dr. Daniel Kuhn für den Bindetaschenvergleich zwischen den Cyclooxygenasen 1 und 2 mit Thrombin
- Herrn Christof Gerlach für seine Kristallisationsversuche verschiedener Fettsäuren mit Thrombin, die Berechnung der Thrombingröße und zahlreiche Literaturhinweise
- Frau Tanja Buß für die Kooperation auf dem Gebiet der Gerbstoffe
- Den Mitgliedern der Arbeitskreise Hanefeld und Imming für Chemikalien und Know-How

- Den Studenten Christian Sinning, Michael Bittern, Bernhard Baum, Thorsten Wilkening, Christian Hobler, Constanze Hasenbein, Christian Fode, Sylvie Huguenin, Alexander Retzlaff und Jens Weinberg für ihre Hilfe
- Frau Dr. Wibke Diederich, Herrn Markus Frey und Herrn Holger Steuber für die Überlassung von Laborgeräten
- Frau Simona Cuzic, Frau Katrin Silber und Herrn Raymond Reif für ihre Hilfe auf dem Gebiet der Enzymkinetik
- Frau Jutta Fuchs für die Überlassung von Tween 20
- Meinen Geschwistern Dr. Monika Rack und Dr. Roland Rack für das Korrekturlesen des Manuskripts
- Meinen Eltern Dr. Wolfgang Rack und Agnes Rack für das Korrekturlesen des Manuskripts und ihre großzügige Unterstützung in all den Jahren

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Theoretischer Teil

1	Einleitung	1
1.1	Wieso neue Thrombininhibitoren ?	1
1.2	Wieso aus Pflanzenextrakten ?	2
1.3	Aufbau der Arbeit und Vorgehensweise	4
2	Thrombin	6
2.1	Struktur und Funktion	6
2.2	Blutstillung	8
3	Thrombose	11
4	Gerbstoffe	13
4.1	Allgemeines	13
4.2	Pharmakologische Wirkungen von Gerbstoffen	15
4.3	Analytik von Proanthocyanidinen	16
4.3.1	Einleitung	16
4.3.2	Quantifizierung von Gerbstoffen	17
4.3.3	Extraktion, Reinigung und Trennung von Gerbstoffen	18
4.3.4	Charakterisierung	19
5	Fettsäuren	21
5.1	Allgemeines	21
5.2	Fettsäuren und kardiovaskuläre Erkrankungen	23
5.2.1	Einfluss von Omega-9 Fettsäuren	23
5.2.2	Einfluss von Omega-6 Fettsäuren	24
5.2.3	Einfluss von Omega-3 Fettsäuren	25
5.2.4	Einfluss gesättigter und Trans-Fettsäuren	26
5.3	Analytik von Fettsäuren	27
6	Bearbeitete Arzneidrogen	29
6.1	Cortex Cinnamomi	29
6.2	Herba Adonidis	29

6.3	Semen Erucae	30
6.4	Flores Sambuci	30
7	Screening von 78 Arzneidrogen auf ihre Thrombin hemmende Wirkung	31
7.1	Einleitung	31
7.2	Verwendetes Testsystem	32
7.3	Extraktion und erste Testserie	33
7.4	Fällung von Gerbstoffen und erneute Testung	34
7.5	Größenausschlußchromatographie und Testung auf makromolekulare Inhibitoren	36
7.6	Test auf „promiscuous“ Inhibitoren	37
7.7	Diskussion	37
8	Vergleich verschiedener Fällungsmethoden zur Entfernung von Gerbstoffen	40
8.1	Einleitung	40
8.2	Bestimmung der Effektivität der Gerbstofffällung.....	41
8.3	Einfluß der Konzentration	41
8.4	Einfluß des pH-Wertes	43
8.5	Einfluß des Lösungsmittels	44
8.5.1	Einfluß von Ethanol.....	44
8.5.2	Einfluß von Methanol.....	45
8.5.3	Einfluß von Dimethylsulfoxid.....	46
8.6	Einfluß der Fällungsreagenzien auf andere Phenole	48
8.7	Einfluß der Assaybedingungen auf die Fällung von Gerbstoffen	49
8.8	Einfluß der Fällungsreagenzien auf die Aktivität von Thrombin.....	49
8.9	Diskussion	50
9	Selektivität der Wechselwirkung kondensierter Gerbstoffe mit Proteinen	53
9.1	Einleitung	53
9.2	Gewinnung von biologisch aktiven kondensierten Gerbstoffen aus Zimtrinde.....	54
9.3	Bestimmung der Fällungsmaxima für die verwendeten Proteine.....	55
9.4	Säurekatalysierter Abbau kondensierter Gerbstoffe in Gegenwart von Phloroglucinol	56

9.5	Zusammensetzung der biologisch aktiven Gerbstoffe nach der Fällung mit den unterschiedlichen Proteinen.....	59
9.6	Diskussion	61
10	Fettsäuren in Herba Adonidis, Flores Sambuci, Semen Erucae und ihre Hemmung von Thrombin	63
10.1	Einleitung	63
10.2	Extraktion und präparative DC.....	66
10.3	Identifizierung der Fettsäuren.....	66
10.4	Verteilung der Fettsäuren	66
10.5	Hemmung von Thrombin durch Fettsäuren und Fettsäuregemische.....	68
10.6	Diskussion	69
11	Hemmung von Thrombin durch Fettsäuren.....	71
11.1	Einleitung	71
11.2	Hemmung von Thrombin durch verschiedene Fettsäuren.....	71
11.3	Physikochemische Eigenschaften der Fettsäuren	72
11.4	Inhibition in Gegenwart eines anderen Proteins.....	74
11.5	Reversible oder irreversible Inhibition ?	75
11.6	Zeitabhängigkeit der Hemmung	76
11.7	Einfluß der Inkubationszeit	77
11.8	Einfluß der Inhibitorkonzentration auf die Hemmung	78
11.9	Einfluß der Änderung der Testbedingungen	79
11.10	Geht Ölsäure in die Bindetasche ?.....	79
11.11	Diskussion	81
12	Entwicklung eines Gerbstofffällungsassays für Thrombin	83
12.1	Einleitung	83
12.2	Anwendung auf eine Substanz-Inhibitor-Bibliothek.....	85
12.3	Diskussion	88
13	Zusammenfassung und Bewertung.....	89

Experimenteller Teil

1	Allgemeine Methoden und Materialien.....	93
---	--	----

1.1	Chromatographie	93
1.1.1	HPLC-Geräte	93
1.1.2	HPLC Bedingungen.....	94
1.2	Lösungsmittel	96
1.3	Massenspektrometrische Bestimmungen	97
1.4	UV Spektrometer	97
1.5	NMR Spektroskopie	97
1.6	pH-Meter	97
1.7	Zentrifugen	97
1.8	Vakuumkonzentrator	98
1.9	Ultraschallgeräte.....	98
1.10	Drogen	98
1.11	Proteine.....	98
1.12	Chemikalien, Material und Referenzsubstanzen	99
2	Inhibition von Rinderthrombin.....	100
2.1	Plate Reader	100
2.2	Durchführung	100
3	Screening	101
3.1	Extraktion	101
3.2	Thrombinhemmung durch Drogen; erste Testserie	102
3.3	Fällung der Gerbstoffe.....	105
3.4	Thrombinhemmung durch Drogen; zweite Testserie	105
3.5	Größenausschlußchromatographie	106
3.6	Thrombinhemmung durch Drogen; dritte Testserie	107
3.7	„Promiscuous“ Inhibitoren	107
3.8	Thrombinhemmung durch Drogen; vierte Testserie	108
4	Vergleich Fällungsmethoden.....	108
4.1	Gewinnung des kondensierten Gerbstoffes	108
4.2	Einfluß der Konzentration	108
4.3	Einfluß des pH-Wertes	109
4.4	Einfluß des Lösungsmittels	109
4.5	Einfluß auf andere Phenole.....	110

4.6	Einfluß der Assaybedingungen auf die Fällung von Gerbstoffen	111
4.7	Einfluß der Fällungsreagenzien auf die Aktivität von Thrombin.....	111
5	Selektivität der Wechselwirkung.....	112
5.1	Gewinnung von Gerbstoffen	112
5.2	Bestimmung der Fällungsmaxima.....	112
5.3	Säurekatalysierter Abbau.....	113
5.4	Cochran Test und einfaktorielle Varianzanalyse.....	114
6	Die Fettsäuren in Herba Adonidis, Flores Sambuci, Semen Erucae und ihre Hemmung von Thrombin	116
6.1	Selektive Extraktion und Analytische Extrographie von Herba Adonidis ...	116
6.2	Extraktion	117
6.3	Gewinnung der Fettsäuren durch präparative DC	117
6.4	Herstellung der Fettsäuremethylester	118
6.5	Herstellung der p-Bromphenacylbromide	118
6.6	Reextraktion der Fettsäuren aus wässrigem Medium.....	118
6.7	Hemmung von Thrombin durch die Fettsäuren (I).....	119
6.8	Retentionszeiten und Massenspektren der Fettsäuren.....	119
7	Hemmung von Thrombin durch Fettsäuren.....	121
7.1	Hemmung von Thrombin durch die Fettsäuren (II)	121
7.2	Inhibition von Thrombin durch Ölsäure in Gegenwart von β -Glucosidase .	121
7.3	Reversible oder irreversible Inhibition ?	121
7.4	Zeitabhängigkeit der Hemmung	122
7.5	Einfluß der Inkubationszeit	122
7.6	Einfluß der Inhibitorkonzentration auf die Hemmung	122
7.7	Einfluß der Änderung der Testbedingungen	122
7.8	Geht Ölsäure in die Bindetasche ?.....	122
8	Durchführung des Gerbstofffällungsassay	123
	Anhang	125
	Literatur und Quellenverzeichnis	129

Abkürzungen und Akronyme

FDA	Food and Drug Administration
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
kDa	Kilodalton
Arg	Arginin
Ser	Serin
His	Histidin
Asp	Asparagin
PAR	Protease aktivierter Rezeptor
GP	Glykoprotein
ADP	Adenosindiphosphat
LDL	Low density lipoproteins
Abb.	Abbildung
BSA	Bovines Serumalbumin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
NMR	Kernresonanz
GC	Gaschromatographie
HDL	High density lipoproteins
DC	Dünnschichtchromatographie
NYHA	New York Heart Association
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
DMF	Dimethylformamid
IC50	Inhibitorkonzentration, die eine 50%-ige Hemmung des Enzyms bewirkt
AUC	Area under the curve
UV	Ultraviolet
LC	Flüssigkeitschromatographie
MS	Massenspektrometrie
EI	Elektronenstoß-Ionisation
NIH-U	Einheiten des National Institut of Health, Bethesda, USA

Ki	Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Reaktion in Gegenwart eines Inhibitors
pNA	Para-Nitroanilin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEA	Triethylamin
t _R	Retentionszeit (Min)
M+	Molekülion
i.E.	internationale Einheiten

Theoretischer Teil

1 Einleitung

1.1 Wieso neue Thrombininhibitoren ?

Die Hälfte aller Sterbefälle in Deutschland sind thrombosebedingt oder thrombosemitbedingt. Davon ereignen sich über achtzig Prozent der Todesfälle in der Gruppe der über 60jährigen [1,2]. Nach Schätzungen wird diese Altersgruppe im Jahr 2050 37 % der Bevölkerung ausmachen. Bereits ab dem Jahr 2020 wird die Gruppe der 50 – 64 Jährigen 39 % des Arbeitskräftepotentials stellen [3].

Für die Primär- und Sekundärprophylaxe thromboembolischer Krankheiten stehen Antikoagulantien und Thrombozytenaggregationshemmer zur Verfügung. Innerhalb der 33 verordnungstärksten Indikationsgruppen hatten im Jahr 2003 Antikoagulantien die stärksten Zuwachsraten (+ 11,8 %) und Thrombozytenaggregationshemmer die drittstärksten Zuwachsraten (+ 10,5 %). Zwischen 1994 und 2003 hat sich die Verordnungshäufigkeit der Antikoagulantien fast verdreifacht, die der Thrombozytenaggregationshemmer fast versechsfacht [4]. Nach Schätzungen wird sich der Markt für antithrombotische Medikamente von 2001 bis 2010 mehr als verdoppeln [5].

Etwa eine halbe Millionen Menschen in Deutschland werden derzeit mit Antikoagulantien behandelt [6]. Dabei werden Heparine und Vitamin K Antagonisten seit über 50 Jahren erfolgreich in der Therapie thromboembolischer Erkrankungen eingesetzt. Trotzdem weisen beide Substanzgruppen Beschränkungen bei der Anwendung auf. Heparine müssen parenteral appliziert werden und hemmen nur das freie Thrombin, nicht aber das fibrin gebundene. Vitamin K Antagonisten haben ein schmales therapeutisches Fenster bei gleichzeitigem Interaktionsrisiko mit Nahrungs- und Arzneimitteln, sowie eine interindividuell variable Kinetik [7,8]. Eine Konsequenz ist, dass, trotz Therapiebedarf, nicht ausreichend mit Antikoagulantien behandelt wird. So erhalten 41 % aller Patienten mit Vorhofflimmern keine antithrombotische Therapie, obwohl ihr Schlaganfallrisiko fünffach höher ist [9,10].

Im Juni 2004 wurde mit Ximelagatran der erste direkte Thrombininhibitor, der oral verfügbar ist, europaweit (bis auf Großbritannien und Irland) für die Indikation der kurzzeitigen Thromboembolieprophylaxe zugelassen. Dieser Wirkstoff erfüllt viele

Anforderungen, die an ein ideales Antikoagulanzen gestellt werden. Man kann ihn in einer fixen Dosierung geben, er verfügt über einen schnellen Wirkungseintritt und hemmt auch fibrinogen gebundenes Thrombin. In zahlreichen Studien konnte dieser Wirkstoff seine Wirksamkeit belegen. Allerdings haben zwei amerikanische Studien (EXULT A; EXULT B) gezeigt, dass es bei höherer Dosierung, sowie bei längerfristiger Anwendung zu Leberschädigungen kommen kann. Aus diesem Grund hat die amerikanische Zulassungsbehörde FDA im Oktober 2004 diesem Wirkstoff die Zulassung verweigert. Bei Patienten mit Leberfunktionsstörungen ist Ximelagatran kontraindiziert. Das Bundesministerium für Arzneimittel und Medizinprodukte empfiehlt eine Kontrolle der Leberfunktion 4-6 Wochen nach Beendigung der Therapie [11]. Ob sich Ximelagatran in der Langzeittherapie und somit als Ersatz für Vitamin K Antagonisten bewähren wird, ist derzeit also fraglich.

1.2 Wieso aus Pflanzenextrakten ?

Die Geschichte der Entdeckung und Entwicklung von Antikoagulantien spiegelt die Bedeutung der Naturstoffe bei der Wirkstofffindung wieder. Bereits 1884 entdeckte Haycraft die gerinnungshemmende Wirkung des Blutegels, aus dem Markwardt 1955 Hirudin isolierte. 1916 isolierte MacLean Heparin aus Hundeleber. 1924 beobachtete Schofield Blutungen bei Rindern, die verdorbenen Steinklee verzehrt hatten. Dies führte 1939 zur Identifizierung von Bishydroxycumarin durch Campbell und Link [12-14].

Auch bei der Entwicklung von Ximelagatran orientierte man sich an dem natürlichen Substrat von Thrombin, dem Fibrinogen [15]. Damit gehört Ximelagatran zu 20 % aller zwischen 1981 bis 2002 bei der FDA zugelassenen Arzneistoffen, die nach Newman zu den „Natural Products Mimics“ gehören. Weitere 28 % der in diesem Zeitraum zugelassenen Arzneistoffe sind Naturstoffe oder Naturstoffderivate [16].

Naturstoffe unterscheiden sich strukturell stark von synthetisch hergestellte Substanzen. Sie besitzen im Durchschnitt eine andere Zusammensetzung an Heteroatomen, ein höheres Molekulargewicht, sowie mehr Chiralitätszentren [17]. Während bei kombinatorischen Bibliotheken viele Fragmente, jedoch wenige Reaktionen zur Verfügung stehen, werden Naturstoffe durch einfache Grundbausteine mit komplexen Synthesen hergestellt. So sind durchschnittlich zwischen 20 bis 40 Schritte notwendig, um einen fertigen Naturstoff zu synthetisieren [18]. Eneidiene C 1027, ein

Antibiotikum mit antitumorale Wirksamkeit, wird beispielsweise aus fünf Fragmenten in 55 enzymatisch katalysierten Reaktionsschritten hergestellt [18].

Die mögliche Anzahl an niedermolekularen Kohlenstoffverbindungen sowie an Proteinen ist nahezu unendlich. Tatsächlich aber scheint der „biologisch relevante chemische Raum“ [19] wesentlich kleiner. So wird die Anzahl der niedermolekularen Verbindungen, die die Funktionen des menschlichen Körpers steuern, auf wenige Tausend geschätzt [19]. Die geschätzte Anzahl verschiedener Proteinfaltungen wird lediglich auf maximal 10000 beziffert [20]. Naturstoffe werden geschaffen, um mit Biomolekülen wie DNA, RNA und Proteinen wechselzuwirken. Zum einen, um eine Funktion innerhalb des Organismus auszuüben, und zum anderen, um sich vor natürlichen Feinden zu schützen. Waldmann nennt sie deshalb „biologisch validierte Startpunkte im Strukturraum“ [21] für die Suche nach Leitstrukturen [19,21,22].

Doch die Verwendung von Naturstoffen als Ausgangspunkt für die Suche nach Leitstrukturen birgt auch viele Probleme. So ist die Isolierung, einschließlich der Strukturaufklärung, langwierig. Dabei ist unklar, ob der gefundene Naturstoff chemisch einfach synthetisierbar oder derivatisierbar ist [23]. Zusätzlich ist die rechtliche Situation zur Verwertung von in fremden Ländern gesammelten Naturstoffen schwierig [24]. Bei derzeitigen Entwicklungskosten von 800 Millionen US Dollar pro Arzneistoff bedeutet dies für viele Pharmafirmen ein zu hohes finanzielles Risiko [25].

Pflanzen bieten innerhalb der Gruppe der Naturstoffe die einfachste Möglichkeit des Upscalings, welches sowohl die korrekte Identifizierung als auch die Logistik umfasst. Innerhalb der 250000 bisher beschriebenen Pflanzen wurden erst 10 % näher untersucht, darunter viele mit Techniken, die längst durch leistungsfähigere Techniken ersetzt wurden [26]. Die Firma Lilly hat für die Entdeckung der Arzneistoffe Vincristin, Vinblastin, 9-Methoxyellipticine und Acronycine insgesamt nur 400 Pflanzen getestet. Dies entspricht einer Trefferquote von 1:100 [27].

Über 80 % der Weltbevölkerung verwendet ausschließlich Pflanzen als Arzneimittel [28]. Bei diesen Pflanzen kann eine gute Verträglichkeit angenommen werden. „In essence, the clinical trials for these drugs have all been run before the scientist arrives and all the ethnopharmacology team must do is to isolate and define that useful activity in an orderly way“ [27].

1.3 Aufbau der Arbeit und Vorgehensweise

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung von Thrombininhibitoren aus Pflanzen. Das Target Thrombin wird in Kapitel 2 vorgestellt. Die Krankheit, bei der eine Hemmung von Thrombin sinnvoll ist, die Thrombose, wird in Kapitel 3 vorgestellt.

Die beiden Naturstoffklassen, die das Bild dieser Arbeit prägen, Gerbstoffe und Fettsäuren, werden in den Kapiteln 4 und 5 vorgestellt. Beiden Naturstoffklassen werden positive Effekte bei einer Vielzahl von Erkrankungen, besonders kardiovaskulären Erkrankungen, nachgesagt. Die Mechanismen werden innerhalb dieses Kapitels kurz angerissen. Desweiteren werden allgemeine Methoden zur Analytik von Gerbstoffen und Fettsäuren besprochen, die die Vorgehensweise für die späteren Experimente erklären.

In dem Kapitel 6 werden die Drogen vorgestellt, die näher bearbeitet wurden.

Als Ausgangspool zur Auffindung eines Thrombininhibitors wurde eine Pflanzenbibliothek verwendet. In einem ersten Schritt mußte also eine Pflanze gefunden werden, die ausreichend wirksam ist. Kapitel 7 beschreibt das „Screening von 78 Arzneidrogen auf ihre Thrombin hemmende Wirkung“. Dabei geht es um das Auffinden einer wirksamen Pflanze unter Elimination „falsch positiver“ Treffer.

Ein Eliminationsschritt innerhalb dieses Screenings war die Entfernung solcher Drogen, deren Thrombinhemmung ausschließlich durch Gerbstoffe verursacht wird. Kapitel 8 vergleicht verschiedene Fällungsmethoden zur Entfernung von Gerbstoffen. Ziel war es, diesen Eliminationsschritt zu optimieren sowie in einem breiteren Kontext zu evaluieren.

Am Beispiel der Gerbstoffe wurde auch exemplarisch die Frage untersucht, ob es überhaupt sinnvoll ist, Eliminationsschritte vorzunehmen, beziehungsweise, ob es tatsächlich so etwas wie „falsch positive“ Treffer gibt. Daher untersucht Kapitel 9 die Frage der „Selektivität der Wechselwirkung kondensierter Gerbstoffe mit Proteinen“, darunter auch Thrombin.

Zwölf Extrakte kamen nach dem Screening für eine weitere Aufarbeitung in Betracht, unter denen *Adonis vernalis*, *Sinapis alba* und *Sambucus nigra* für die weitere Bearbeitung und die Isolierung des Thrombininhibitors ausgewählt wurde. Es zeigte sich, dass Fettsäuren das wirksame Prinzip aller drei Pflanzen darstellte. Kapitel 10 beschreibt die Identifizierung der „Fettsäuren in *Herba Adonidis*, *Flores Sambuci* und *Semen Erucae* und ihre Hemmung von Thrombin“.

Nachdem sich zeigte, dass nur bestimmte Fettsäuren Thrombin hemmten, sollte durch Testung zusätzlicher Fettsäuren ein Einblick in Struktur-Wirkungs-Beziehungen gewonnen werden. Außerdem wurden Versuche durchgeführt, um die Art der Hemmung näher zu charakterisieren. Kapitel 11 beschreibt die „Hemmung von Thrombin durch Fettsäuren“ in einem weiteren Zusammenhang.

Kapitel 12 handelt von der „Entwicklung eines Gerbstofffällungsassays für Thrombin“, welcher einen alternativen Weg, beziehungsweise eine Ergänzung zur Isolierung von Pflanzeninhaltsstoffen durch wirkorientierte Fraktionierung darstellt.

Eine Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse befindet sich in Kapitel 13.

2 Thrombin

2.1 Struktur und Funktion

Thrombin ist eine Serinprotease und wird als Prothrombin in der Leber gebildet. Sein Molekulargewicht beträgt 39 kDa. Das Enzym besteht aus einer A und B Kette, die durch 4 Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Neben seiner zentralen Bedeutung bei der Blutstillung zeigt es eine Reihe weiterer Wirkungen auf die Zellen des Endothels, der Neuronen und der glatten Muskelzellen sowie auf Lymphozyten, Fibroblasten und Monozyten, bzw. Makrophagen [29].

Thrombin ist ein ellipsoides Molekül, auf dessen Vorderseite sich eine von West nach Ost verlaufende Spalte (die Active Site) befindet (siehe Abb. 1). Die Active Site des Thrombins ist eng und tief. Ihr Zugang für makromolekulare Substanzen wird durch einen 60er Loop im Norden und eine weitere Schleife im Süden begrenzt. Der 60er Loop bildet auch den Deckel für die S2 Tasche¹, so daß nur mittelgroße, hydrophobe Aminosäuren wie Valin oder Prolin Platz finden. Die S2 Tasche schließt an eine weitere hydrophobe Stelle im Westen an, die S3 Region, die auch als Aromatenbindungsstelle bezeichnet wird. Auf dem Boden der Spezifitätstasche S1 befindet sich ein Aspartat-Rest, welcher mit basischen Gruppen wechselwirken kann. Thrombin spaltet demnach bevorzugt Arg-X-Peptidbindungen. In der S1 Tasche befindet sich die katalytische Triade Ser-His-Asp und das Oxyanion Hole, welches über NH-Gruppen die negative Ladung des Übergangszustandes stabilisiert. Aufgrund fehlender Strukturinformationen ist wenig bekannt über die Bindungsregionen S1', S2' und S3'. Die S1' Bindungsregion ist allerdings aufgrund ihrer Größe für die Aufnahme kleiner Aminosäuren wie Glycin, Alanin oder Serin geeignet.

Im Unterschied zu anderen Serinproteasen der Gerinnungskaskade besitzt Thrombin zwei stark positiv geladene Regionen. Die Fibrinogenerkennungsregion (auch Exosite I) befindet sich östlich und die Heparinbindungsregion (Exosite II) befindet sich nördlich. Die Fibrinogenexosite bildet die Erkennungsregion für viele makromolekulare Liganden wie Fibrinogen, Thrombomodulin, PAR1, Heparin Cofaktor II, Hirudin,

¹ Verwendet wird die Nomenklatur nach Schechter und Berger [30], in der die Positionen der Aminosäuren des Substrats mit P3, P2, P1, P1', P2', P3' bezeichnet werden. Dabei ist P1 die Aminosäure vor der Spaltstelle und P1' die Aminosäure nach der Spaltstelle. Die Bindetaschen werden analog mit S1 und S1' bezeichnet.

sowie die Gerinnungsfaktoren V, VIII und XIII. Die Fibrinogenerkennungsregion hilft dabei die Substrate in die Active Site zu steuern. An der Wechselwirkung zwischen Fibrinogenerkennungsregion und Substrat sind ionische und hydrophobe Bindungen beteiligt. Die Heparinbindungsstelle bildet das stärkste elektrostatische Feld auf dem gesamten Molekül. Die Heparinbindungstelle interagiert mit Makromolekülen wie Heparin und Thrombomodulin. Im Gegensatz zur Exosite I befinden sich hier kaum hydrophobe Stellen.

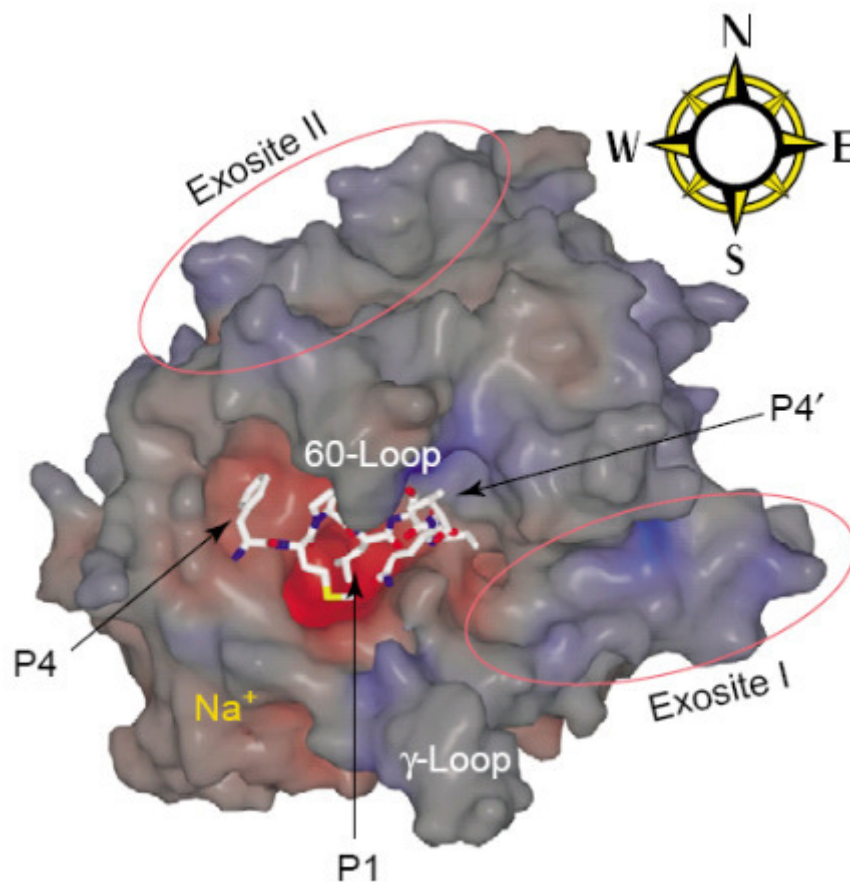


Abbildung 1: Thrombin, Oberflächendarstellung mit einem Peptid in der Active Site [31]

Thrombin ist ein konformativ flexibles Enzym und wird durch eine Reihe von Liganden allosterisch beeinflusst. Dadurch besitzt Thrombin sowohl prokoagulierende wie auch antikoagulierende Eigenschaften. Der wichtigste Ligand ist Na^+ , welches eine Bindungsstelle südwestlich der Active Site besitzt. Durch das Andocken von Na^+ wird aus der „slow“ (Na^+ frei) Form des Thrombins die „fast“ (Na^+ gebunden) Form, welche die prokoagulatorischen Eigenschaften mehr als 20fach steigert. Die „fast“ Form zeigt eine höhere Spezifität für Fibrinogen, Fibrin, PAR-1, PAR-3, PAR-4, Thrombomodulin

und Antithrombin, während die „slow“ Form erhöhte Spezifität gegenüber Protein C besitzt. Unter physiologischen Bedingungen ist das Verhältnis von slow:fast 2:3. Fibrinogen und Fibrin verschieben das Verhältnis zu Gunsten der „fast“ Form, während Heparin, Protein C, Thrombomodulin und Antithrombin die „slow“ Form stabilisieren. Zusätzlich wird das Verhältnis durch die Konzentration von Na^+ im Blut beeinflusst [32-39].

2.2 Blutstillung

Um den Organismus vor dem Verlust von Blut zu schützen, müssen Verletzungen im Blutgefäßsystem schnell abgedichtet werden. Bei der primären Hämostase kommt es zu einer Anlagerung von Blutplättchen sowie einer Vasokonstriktion und damit zu einer Abdichtung der Gefäßwand. Bei der sekundären Hämostase kommt es zur Bildung von Fibrin, welches den Plättchenpfropf stabilisiert.

Im Falle einer Gefäßverletzung kommt es zur Anheftung der Thrombozyten an das freigelegte Subendothel. Dies geschieht hauptsächlich über das Matrixprotein Kollagen und den von Willebrand Faktor (vWF) auf Seiten des Subendothels und den auf dem Blutplättchen sich befindlichen Rezeptoren GPIa-IIa (syn. Integrin $\alpha 2\beta 1$) und GPVI für Kollagen und dem Rezeptor Glykopeptid Ib des Rezeptorkomplexes GPIIb-IX-V für den vWF. Die Bindung der Blutplättchen an die Rezeptoren führt über eine Reihe von Folgereaktionen zu ihrer Aktivierung. Dabei ändert sich die Form der Blutplättchen, der Anteil von Phosphatidylserin in der Außenmembran wird erhöht und die Phospholipidmembran ist negativ geladen. Sämtliche Enzyme des Tenase und Prothrombinase Komplexes haben eine erhöhte Affinität zu dieser Oberfläche. Zusätzlich kommt es zu der Freisetzung von ADP und Thromboxan A₂ (TxA₂) aus den Thrombozyten. ADP und TxA₂ wechselwirken mit ihren spezifischen Rezeptoren (P₂Y₁ und P₂Y₁₂ für ADP, TP für TxA₂) auf den Blutplättchen und führen so zu ihrer weiteren Aktivierung und Formveränderung. Während der Aktivierung der Thrombozyten wird der Rezeptor GPIIb/IIIa (syn. Integrin $\alpha \text{IIb-}\beta 3$) aktiviert. Aktiviert ist dieser Rezeptor in der Lage, Fibrinogen und den vWF zu binden. Dies führt zu einer Verknüpfung der Thrombozyten [40-43].

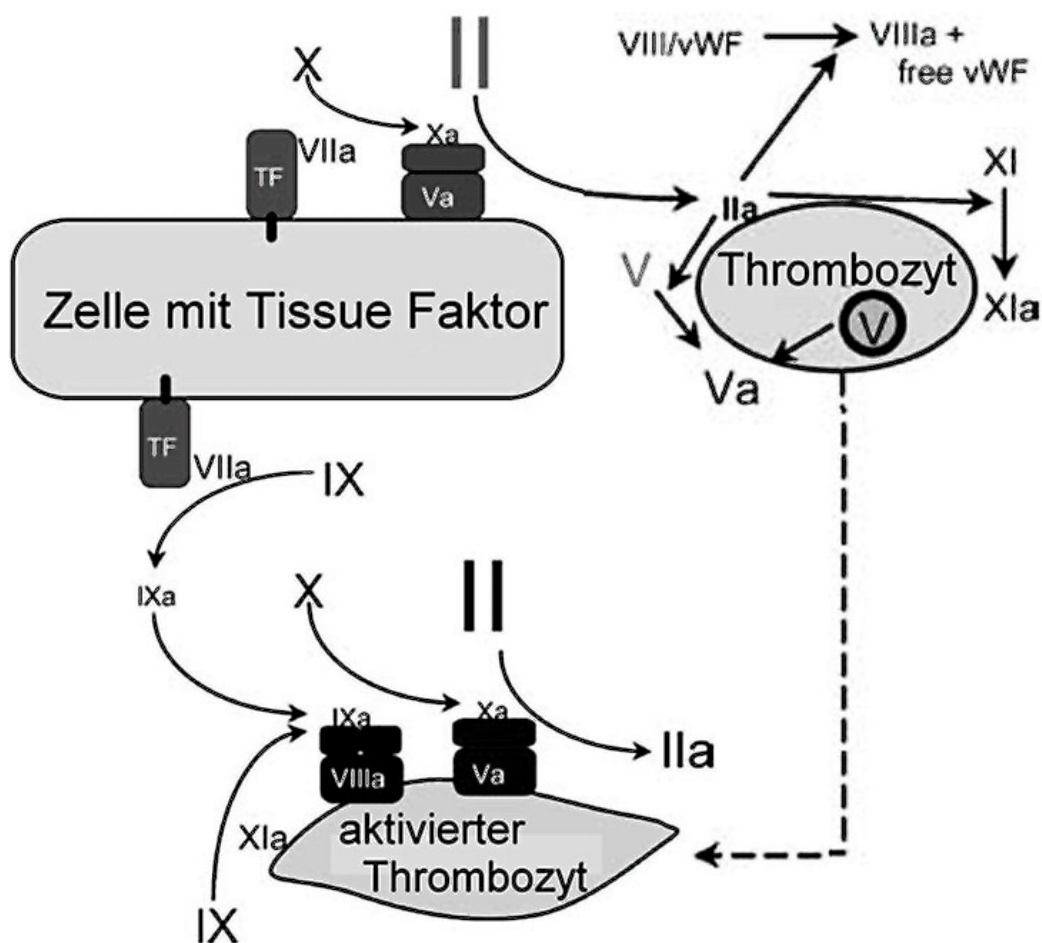


Abbildung 2: Zellmodell der Blutgerinnung (modifiziert nach [44]), Faktor II = Prothrombin, Faktor IIa = Thrombin; Die Bezeichnung „a“ kennzeichnet die aktivierte Form

Durch eine Gefäßverletzung kommt es zum Kontakt des Plasmas mit dem Tissue Faktor (TF). Faktor VII, welcher in geringen Maßen in aktiviertem Zustand bereits im Plasma vorliegt, bindet an diesen Rezeptor (siehe Abb. 2). Der entstehende Faktor VIIa/TF Komplex aktiviert die Faktoren X und IX, welche im Plasma vorkommen. Der entstehende Faktor Xa kann wiederum Faktor V aktivieren. Faktor Xa bildet zusammen mit Faktor Va den Prothrombinase Komplex und aktiviert wenig Thrombin. Dies findet auf der Zelloberfläche statt, da der abdiffundierende Faktor Xa sofort von Antithrombin (AT) oder Tissue Faktor Pathway Inhibitor (TFPI) inaktiviert würde. Faktor IXa hingegen wird nicht durch TFPI gehemmt und durch AT wesentlich langsamer. Das entstehende Thrombin wiederum wechselwirkt über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR 1, PAR 4) mit den Thrombozyten. Dies führt zu einer weiteren Aktivierung der Thrombozyten, bei der unter anderem Faktor V aus den Granula der Thrombozyten freigesetzt wird. Faktor V wird durch Thrombin aktiviert, ebenso wie Faktor VIII und

Faktor XI. Faktor VIII wird dabei von dem vWF abgespalten, an den dieser im Plasma gebunden ist. Die aktivierten Faktoren befinden sich auf der Oberfläche der Thrombozyten. Faktor IXa, gebildet durch den TF/VIIa Komplex, diffundiert bis zur Thrombozytenoberfläche. Dort bildet dieser Faktor mit Faktor VIIIa den Faktor IXa/VIIIa Tenase Komplex, welcher Faktor X aktiviert. Der aktivierte Faktor Xa bildet zusammen mit Faktor Va den Prothrombinase Komplex, diesmal auf der Oberfläche der Thrombozyten. Dieser Komplex aktiviert wiederum Thrombin, welches Fibrinogen in Fibrin spaltet. Der durch Thrombin aktivierte Faktor XIII, welcher im Plasma vorkommt, führt zu einer weiteren Quervernetzung des Fibrinnetzes [44-50].

Um eine Ausweitung der Blutgerinnung zu verhindern, stehen verschiedene blutgerinnungshemmende Mechanismen zur Verfügung. Antithrombin inaktiviert die meisten frei im Plasma vorkommenden Serinproteasen durch Bildung von 1:1 Komplexen. Diese Inaktivierung wird verstärkt durch Kontakt mit Glucosaminoglycanketten (ähnlich Heparin), die sich an der Oberfläche von intakten Endothelzellen befinden [51]. Ein weiterer direkter Protease Hemmstoff ist der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), welcher in freier Form im Plasma sowie an Lipoproteinen und Endothelzellen gebunden vorkommt. TFPI blockiert den Tissue Factor/Faktor VIIa Komplex [52]. Ein dritter Mechanismus der Blutgerinnungshemmung erfolgt über Protein C. Überschüssiges Thrombin bindet an Thrombomodulin, welches sich auf der Oberfläche von intakten Endothelzellen befindet. Dies führt zu einer Aktivierung von Vitamin-K abhängigen Protein C. Aktiviertes Protein C inaktiviert den aktivierten Faktor VIIIa und den aktivierten Faktor Va durch Proteolyse. Die Aktivität von Protein C kann durch Protein S, welches im Plasma frei vorkommt und als Cofaktor fungiert, verstärkt werden. [46]. Die Aktivierung von Protein C kann durch die vorherige Bindung von Protein C an den endothelialen Protein C Rezeptor gesteigert werden [53,54].

3 Thrombose

Eine Thrombose ist definiert als intravitale Blutgerinnung in einem Gefäß oder einer Herzhöhle durch ein als Thrombus bezeichnetes, fibrinhaltiges Thrombozytenaggregat [55]. Es handelt sich demnach um eine Blutgerinnselbildung in der Blutstrombahn, die nicht der Blutstillung nach einer Verletzung dient, sondern die Blutströmung in dem betroffenen Gefäß krankhaft behindert [1]. Kommt es zur Ablösung des Thrombus und einer Verschleppung in enger werdende Gefäße mit der Folge des Verschlusses, handelt es sich um eine Thromboembolie [55]. Die Bildung einer Thrombose ist ein pathophysiologischer Schlüsselmechanismus bei einer Vielzahl von Krankheiten, wie Herzinfarkt, Schlaganfall, Lungenembolie oder Venenthrombose [56].

Die pathogenetischen Faktoren der Thrombusentstehung hat Virchow bereits 1856 aufgestellt (Virchow Trias). Die Faktoren sind: Gefäßwandschädigung (z.B. Endothelläsion bei Arteriosklerose), gestörte Blutströmung (z.B. Verlangsamung des venösen Rückstroms bei Herzinsuffizienz) und Änderung der Blutzusammensetzung (z.B. Erhöhung der Thrombozytenzahl durch bösartige Erkrankung blutbildender Organe) [56].

Nach Art der Lokalisation kann man zwischen venösen und arteriellen Thrombosen unterscheiden. Arterielle Gefäßverschlüsse entstehen überwiegend auf dem Boden arteriosklerotisch veränderter Gefäße [57]. Im Gegensatz zur venösen Thrombose spielen hier Störungen der Blutgerinnung eine untergeordnete Rolle [58]. Bei erhöhter Schergeschwindigkeit (wie sie im arteriellen System vorliegt) werden die Thrombozyten zur Gefäßwand gedrängt, so daß die Adhäsion von Thrombozyten im Bereich von Endothelläsionen begünstigt ist. Im Gegensatz dazu nimmt die Fibrindeposition auf einer thrombogenen Oberfläche mit zunehmender Schergeschwindigkeit ab. Aus diesem Grund findet man Abscheidungsthromben überwiegend im arteriellen und Gerinnungsthromben öfter im venösen Gefäßsystem [56]. Thromboembolische Ereignisse manifestieren sich im arteriellen System überwiegend im Bereich des Herzens, während die tiefe Beinvenenthrombose und die Lungenembolie thromboembolische Ereignisse des venösen Systems darstellen [59]. Die Risikofaktoren und Umstände, die zu Bildung einer Thrombose prädisponieren, sind unterschiedlich. Risikofaktoren, die zur arteriellen Thrombose prädisponieren, sind primär Rauchen, Hypertonie und erhöhtes LDL-Cholesterin (Hypercholesterinämie)

sowie sekundär Diabetes, Übergewicht und Bewegungsmangel. Demgegenüber stellen Alter (>40 Jahre), Immobilisation, Operationen, Übergewicht und die Einnahme hormonaler Kontrazeptiva die Risikofaktoren für die Bildung einer venösen Thrombose dar [56].

Mehr als 90 % der Thrombosen entstehen in den Becken-Bein-Venen und der Vena cava inferior. Nach orthopädischen Eingriffen im Hüft- und Kniegelenkbereich treten in 45 – 70 % der Fälle Thrombosen, und in 1 – 3 % der Fälle Embolien auf. Das Thromboserisiko bei Herzinsuffizienz liegt bei 70 % [60].

4 Gerbstoffe

4.1 Allgemeines

Als Gerbstoffe werden chemische Verbindungen bezeichnet, die tierische Häute gerben, also in Leder verwandeln können [61]. Dabei werden die wenig stabilen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Eiweißketten des Kollagens durch stabile Bindungen mit dem Gerbstoff ersetzt [62]. Unterschieden werden anorganische, synthetisch organische und pflanzliche Gerbstoffe [61]. Um die pflanzlichen Gerbstoffe, auch Tannine genannt, geht es im folgenden.

Bate-Smith und Swain definieren Gerbstoffe als wasserlösliche phenolische Verbindungen mit einem Molekulargewicht zwischen 500 und 3000, die die typischen phenolischen Reaktionen zeigen. Sie haben zusätzlich die Fähigkeit, Alkaloide, Gelatine und andere Proteine zu fällen [63]. Allerdings wurden auch schon Gerbstoffe mit einem Molekulargewicht von 55000 beschrieben [64]. Gerbstoffe sind polyphenolische Metaboliten von höheren Pflanzen [65].

Die Einteilung der Gerbstoffe kann folgendermaßen erfolgen (Abb. 3):

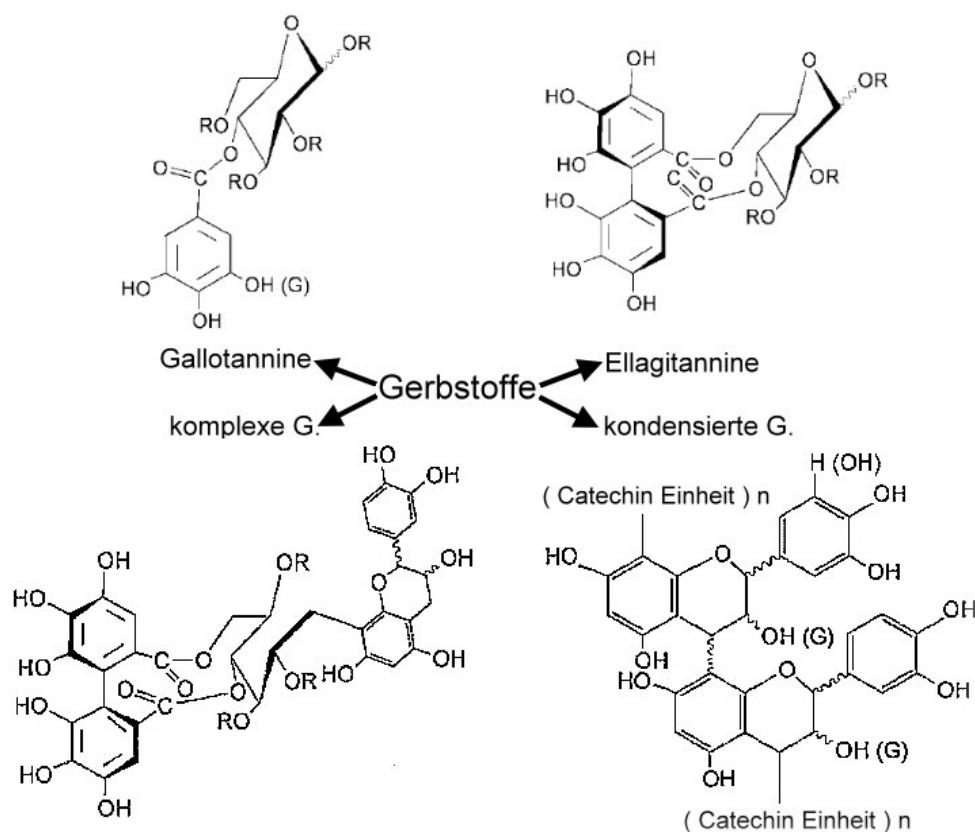


Abbildung 3: Einteilung der Gerbstoffe; modifiziert nach Khanbabaee und van Ree [65]; R = Galloyl Rest (G) oder andere Substituenten

Gallotannine und Ellagitannine werden auch als hydrolysierbare Gerbstoffe zusammengefaßt [66].

Hydrolysierbare Gerbstoffe werden als Ester von Gallussäuren oder von Gallussäure abgeleiteten Phenolcarbonsäuren mit Polyhydroxyverbindungen (meist Monosacchariden) definiert [67]. In den meisten Fällen bildet D-Glucose das Monosaccharid [68]. Ellagitannine werden durch oxidative Kupplung von 2 Galloyleinheiten gebildet [65]. Der Begriff „hydrolysierbar“ resultiert aus der hydrolytischen Spaltung dieser Gerbstoffe in Säuren, Laugen oder in der Gegenwart des Enzyms Tannase [69,65].

Kondensierte Gerbstoffe, oder synonym Proanthocyanidine, sind Oligomere oder Polymere von Polyhydroxyflavan-3-ol Monomeren [70]. Dabei bilden (+)-Catechin und (-)-Epicatechin in den meisten Fällen die Monomere [71]. Die Verknüpfung zwischen den Flavan-3-olen erfolgt meistens über eine C-C Bindung zwischen der C4 Position des einen Monomers mit dem C8 oder dem C6 des zweiten Monomers [66]. Einfach verknüpfte Polymere nennt man B-Typen. Die in der Natur seltener vorkommenden A-Typen sind doppelt verknüpfte Polymere. Diese Art der Verknüpfung kommt durch eine gleichzeitige C-C Verknüpfung zwischen Position 4 und 8 und einer Ether Verknüpfung zwischen der Position 2 und 7 zustande. Kondensierte Gerbstoffe werden in Subklassen unterteilt, von denen drei häufig in Pflanzen vorkommen: Propelargonidine, Procyanidine, Prodelphinidine [72] (Abb. 4).

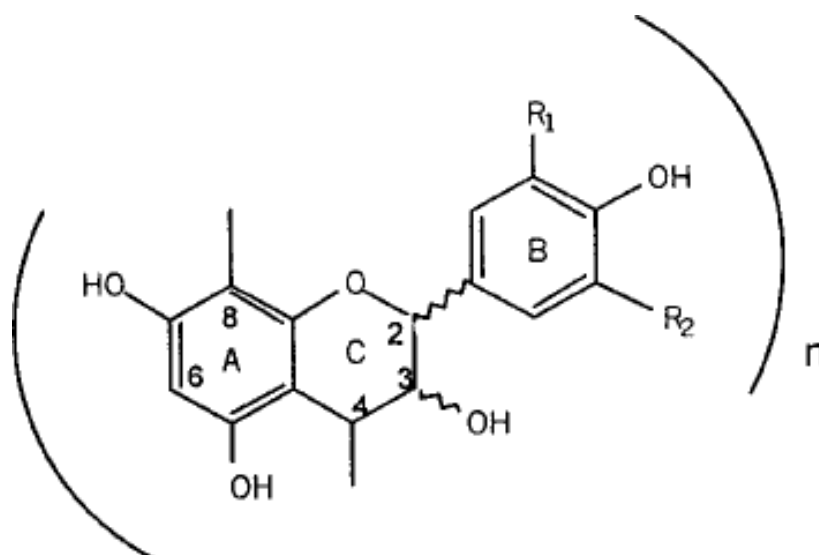


Abbildung 4 [66]: $R_1, R_2 = H$, Propelargonidine; $R_1 = H, R_2 = OH$, Procyanidine; $R_1, R_2 = OH$, Prodelphinidine

Hydrolysierbare Gerbstoffe kommen in der Pflanzenwelt weniger verbreitet vor als kondensierte Gerbstoffe [73]. Gerbstoffe kommen überwiegend in Früchten vor und seltener in Gemüse. Dabei sind besonders Früchte wie Trauben, Äpfel, Birnen, Beeren und Nüsse und Getränke wie Wein, Tee, Bier und Cider reich an Proanthocyanidinen. Auch Kakao und Zimt sind reich an kondensierten Gerbstoffen. Der tägliche Konsum an Proanthocyanidinen liegt bei 53,6 mg/Tag in den USA [74]. Hydrolysierbare Gerbstoffe kommen vor allem in Früchten wie Erdbeeren, Himbeeren, Brombeeren und Mangos vor [69].

Gerbstoffe schützen Pflanzen vor Pflanzenpathogenen und Schäden durch UV Strahlung [75,76].

4.2 Pharmakologische Wirkungen von Gerbstoffen

Einzelne Substanzen oder Gemische aus der Klasse der Gerbstoffe zeigten antisekretorische, peristaltikhemmende, antimikrobielle, entzündungshemmende, antitumorale, antivirale, zahnbelagshemmende und antihypertensive Wirkung [77].

Zahlreiche Ergebnisse deuten daraufhin, daß bestimmte Gerbstoffe günstige Effekte bei kardiovaskulären Erkrankungen haben. So wurde gezeigt, daß die Procyanidine aus Weißdorn die koronare Durchblutung erhöhen und positiv inotrop wirken. Verschiedene Procyanidine hemmen die Ablagerung von Cholesterin in arteriellem Gewebe. Die bereits genannte blutdrucksenkende Wirkung kommt möglicherweise durch eine Hemmung der Phosphodiesterase, der Na⁺/K⁺-ATPase und/oder des Angiotensin-Konversions-Enzym zustande [78]. Die antioxidativen Eigenschaften von Polyphenolen verhindern die Oxidation von LDL-Cholesterin und tragen so einem antiarteriosklerotischen Effekt bei [79]. Die positiven Effekte bei Arteriosklerose konnten in Tiermodellen bestätigt werden [74].

Das französische Paradoxon beschreibt die geringere Rate an kardiovaskulären Erkrankungen in Frankreich im Vergleich zu anderen Industrieländern trotz vergleichbarer Risikofaktoren [80]. Hier wird ein antioxidativer Effekt der im Rotwein enthaltenen Polyphenole vermutet [81]. Desweiteren führen Proanthocyanidine aus Rotwein sowie die Metaboliten von (+)-Catechin zu einer verringerten Adhäsion von Monocyten an Endothelzellen, einem Teilschritt der Arteriosklerose [82,83]. Der 28tägige Konsum von Rotwein verringerte die Zahl arteriosklerotischer

Entzündungsmarker [84]. Es zeigte sich, daß die Polyphenole aus Rotwein vasodilatierende Wirkung haben [85].

Eine Inhibition der Plättchenaggregation wurde für Polyphenole aus Kakao und Wein beschrieben [86]. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass Rotwein die Blutungszeit verlängert [87]. Mit Pedunculagin konnte ein Gerbstoff als kompetitiver Thrombininhibitor aus *Geum japonicum* isoliert werden [88,89].

Die pharmakologischen Wirkungen der Gerbstoffe werden generell auf folgende Eigenschaften zurückgeführt: die Komplexierung von Metallionen, ihre antioxidativen und radikalfangende Eigenschaften und ihre Fähigkeiten, mit Makromolekülen wie Polysacchariden und Proteine wechselzuwirken [68].

Die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen ist abhängig von ihrer Struktur und variiert interindividuell [90]. Innerhalb der kondensierten Gerbstoffe werden wahrscheinlich nur die Mono-, Di- und Trimere unverändert absorbiert, so daß die Effekte der Gerbstoffe wahrscheinlich nur auf Magen und Darm beschränkt sind. Der Abbau sowie die Metabolisierung der Polyphenole findet in der Microflora des Darms und in der Leber statt. Über die Eigenschaften sowie die Art der gebildeten Metaboliten ist wenig bekannt. Jedoch wurden diverse Effekte für einzelne Metaboliten nachgewiesen [66,76]. Neben den positiven gesundheitlichen Effekten der Gerbstoffe wurden auch antinutritive und karzinogene Effekte beschrieben. Gerbstoffe bilden Komplexe mit Proteinen, Kohlenhydraten und Verdauungsenzymen. Eine gerbstoffreiche Ernährung führt zu einer geringeren Aufnahme an Vitaminen, Mineralstoffen und essentiellen Aminosäuren und führt so zu vermindertem Wachstum. In Tiermodellen wurden hepatotoxische und karzinogene Eigenschaften der Gerbstoffe beschrieben. Für das vermehrte Auftreten von Wangen- und Speiseröhrenkrebs im Fernen Osten werden die Gerbstoffe der in diesen Regionen häufig gekauten Betelnuß verantwortlich gemacht [91,92].

4.3 Analytik von Proanthocyanidinen

4.3.1 Einleitung

Die Analytik von Gerbstoffen unterteilt sich in drei Bereiche, die je nach gewünschten Informationen miteinander kombiniert werden. Methoden zur quantitativen Bestimmung von Gerbstoffen dienen der Erfassung der Gesamtmenge an Gerbstoffen in einer Probe. Methoden zur Trennung bzw. Aufreinigung dienen dazu, Gerbstoffe in

reiner Form für die Weiterverwendung in anderen Tests zu gewinnen. Außerdem erlauben sie eine Trennung nach Molekulargewicht. Ein dritter Bereich umfaßt die Methoden, die für eine detailliertere Betrachtung der Gerbstoffe geeignet sind.

4.3.2 Quantifizierung von Gerbstoffen

Die Methoden zur quantitativen Bestimmung von Gerbstoffen können in folgende drei Gruppen eingeteilt werden: kolorimetrische, Fällungs- und sonstige Methoden.

Kolorimetrische Methoden sind einfach und empfindlich. Einige Methoden nutzen die reduzierenden Eigenschaften von Phenolen. Verbreitet ist die Bildung von Berliner Blau, die Reduktion von Kaliumpermanganat (Lowenthal-Methode) und die Reduktion von Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Folin-Denis-Reagenz, Folin-Ciocalteu-Reagenz). Diese Methoden haben den Nachteil, dass sie sämtliche Phenole erfassen und empfindlich gegenüber anderen reduzierenden Pflanzenbestandteilen sind. Andere Methoden nutzen die Bildung von farbigen Kondensationsprodukten. Beispiele sind die Kondensation mit elektrophilen Reagenzien wie Vanillin (Vanillin-HCl Assay) oder Dimethylaminocinnamaldehyd (DMCA) im sauren Milieu. Diese Methoden sind spezifisch für m-dihydroxyphenyl Reste und werden für die Analyse von Flavanolen verwendet. Der Butanol-HCl Assay ist spezifisch für Proanthocyanidine. Er führt zu ihrer Depolymerisation unter Bildung von farbigen Anthocyanidinen [93,94,70].

Fällungsmethoden beruhen auf den Eigenschaften von Gerbstoffen, Proteine zu fällen. Als Protein wird überwiegend Rinderserumalbumin verwendet. Diese Methoden haben den Vorteil, daß die biologische Aktivität der Gerbstoffe erfaßt wird. Generell besteht bei diesen Methoden die Möglichkeit, sowohl das Protein als auch die Gerbstoffe und zwar sowohl im Niederschlag als auch im Überstand zu bestimmen. Zur Bestimmung des gefällten Proteins kann man es vorher farbig oder radioaktiv markieren. Ebenso verwendet wird die Bestimmung der Proteine mit Ninhydrin. Für die Analyse der Gerbstoffe finden die oben genannten kolorimetrischen Methoden Verwendung. Verbreitet ist auch die Färbung der Gerbstoffe mit Eisen-(III)-chlorid. Ein Nachteil der Fällungsmethoden ist, dass sie die Bildung eines unlöslichen Protein-Gerbstoff Komplexes voraussetzen. Die Bildung dieses Komplexes ist allerdings abhängig von einer Reihe von Faktoren, wie der Konzentration von Gerbstoff und Protein, dem pH-Wert, der Temperatur und der Ionenstärke des Lösungsmittels sowie dem Lösungsmittel selbst.

Weitere Methoden zur Quantifizierung von Gerbstoffen sind die Hemmung von Enzymen, gravimetrische Techniken sowie die Diffusion in BSA enthaltendem Agargel [95-97].

4.3.3 Extraktion, Reinigung und Trennung von Gerbstoffen

Die Extraktion von Gerbstoffen erfolgt üblicherweise mit Aceton/Wasser (7:3), auch wenn für bestimmte Pflanzen andere Lösungsmittel zu einer vollständigeren Extraktion führen [98]. Zur Vermeidung der Oxidation der Gerbstoffe werden manchmal Zusätze wie Ascorbinsäure, Trifluoressigsäure oder Essigsäure hinzugegeben. Ebenso sind höhere Temperaturen, sowie starke Exposition gegenüber Licht und Sauerstoff zu vermeiden [99].

Für die Aufreinigung von Gerbstoffen ist die Verwendung von Sephadex LH-20 als Säulenmaterial verbreitet [71]. Ebenso zeigten sich andere Gelmaterialien wie Fractogel TSK HW-40F oder Amberlite XAD-7 geeignet [100,101]. Die Verwendung von C18 Sep-Pak Kartuschen zur Festphasenextraktion wurde erfolgreich eingesetzt [102]. Flüssig/Flüssig-Extraktionsverfahren zeigten sich ebenso wie Fällungsmethoden geeignet [98,103]. Mit diesen Methoden gelingt eine Fraktionierung in oligomere und polymere Proanthocyanidine.

Die Isolierung von reinen Proanthocyanidinen wird mit zunehmendem Polymerisierungsgrad immer schwieriger, da die Anzahl der möglichen Isomere steigt und somit die Menge jedes einzelnen Isomers geringer wird. Durch Überlappung von Retentionszeiten wird die chromatographische Auflösung schlechter [104,99]. Bislang wurden Proanthocyanidine bis zu Pentameren identifiziert und charakterisiert [66].

HPLC auf C18 Säulen ist geeignet für eine Trennung bis zu Tetrameren. Höhere Polymere erscheinen als breiter, un aufgelöster Peak [105]. Hammerstone gelang die Auftrennung von bis zu Decameren auf Normalphasen HPLC [106]. Allerdings handelte es sich dabei um überwiegend aus Epicatechin bestehende Proanthocyanidine. In komplexeren Mixturen konnte die Auflösung nicht mehr erreicht werden [99]. Aufgrund der Adsorption von Proanthocyanidinen an Gelmaterialien wie Sephadex und Fractogel gelingt eine Größenausschlußchromatographie nur unzureichend. Auf Sephadex LH-20, Fractogel (syn. Toyopearl) HW-40(F) und HW-50(F) gelang eine Trennung bis zu tetrameren Proanthocyanidinen [107]. Auch mittels Gegenstromverteilungschromatographie, Dünnschichtchromatographie und

Zentrifugationsverteilungschromatographie gelang eine Trennung bis zu Tetrameren [106].

4.3.4 Charakterisierung

Sofern die Proanthocyanidine in einem reinen Zustand vorliegen, ist es möglich, ihre Struktur mit den gängigen analytischen Methoden aufzuklären. Da ihre Heterogenität jedoch mit ihrer Kettenlänge zunimmt, ist es so gut wie unmöglich, reine Proanthocyanidine jenseits von Pentameren zu isolieren [107].

Mit Hilfe eines säurekatalysierten Abbaus in Gegenwart eines nucleophilen Reagenzes ist es möglich, die Zusammensetzung der Proanthocyanidine sowie die durchschnittliche Kettenlänge zu bestimmen. Unter sauren Bedingungen werden die C-C Bindungen gespalten. Dabei wird das Endstück der Kette als Flavanol freigesetzt, während die anderen Monomere mit den nucleophilen Reagenzien reagieren [108]. Verbreitete Reagenzien sind Phloroglucinol und Benzylmercaptan [109]. Die Abbauprodukte können mittels HPLC oder GC (nach Derivatisierung zu Trimethylsilylether) analysiert werden. Dies setzt allerdings die Identifizierung und Kalibrierung der Abbauprodukte voraus. Zusätzlich wurde eine ^1H NMR Methode zur Analyse der Abbauprodukte beschrieben [110].

Mit Hilfe einer ^{13}C NMR Methode gelingt es, über den Vergleich des Signals für C3 der Endeinheit mit dem der Erweiterungseinheiten, die Kettenlänge abzuschätzen [111]. Der Unterschied zwischen cis/trans lässt sich durch Integration der Signale für das C2 Atom bestimmen [112]. Durch Vergleich der Integrale aller Signale der A-Ring Protonen mit den Integralen der H4 Protonen (nur in Endeinheiten) lässt sich mittels ^1H NMR die Kettenlänge der Proanthocyanidine bestimmen.

Aufgrund der Adsorption an Gelmaterialien ist die Trennung von Proanthocyanidinen nach Molekulargewicht nur nach vorheriger Derivatisierung der Hydroxylgruppen möglich. Diese können acetyliert oder methyliert werden. Anschließend kann die Trennung auf TSK G2500HXL und G3000L Säulen erfolgen. Durch Vergleich mit Polystyrene Standards kann man die Verteilung der Molekulargewichte abschätzen [107].

Die direkte Verwendung von massenspektrometrischen Methoden mit weichen Ionisierungsarten wie Elektrospray-Ionisation (ESI), Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie/Time-of-flight (MALDI-TOF) und Fast

Atom Bombardement (FAB) zeigte sich geeignet für die direkte Analyse von Proanthocyanidinen. MALDI-TOF hat dabei einen größeren Massenbereich als ESI und FAB. Die Quantifizierung mit Hilfe massenspektrometrischer Verfahren ist schwierig [99,107].

5 Fettsäuren

5.1 Allgemeines

Fettsäuren sind langkettige, gesättigte oder ungesättigte aliphatische Monocarbonsäuren mit einer Kettenlänge von mindestens vier Kohlenstoffatomen. In höheren Pflanzen und Tieren vorkommende Fettsäuren haben meistens eine gerade Anzahl von C-Atomen im Bereich C14...C20 und sind unverzweigt. Tragen Fettsäuren eine oder mehrere Doppelbindungen, sind sie ungesättigt. In natürlichen Fettsäuren sind die Doppelbindungen meist isoliert und weisen cis-Konfiguration auf.

Die physikalischen Eigenschaften der Fettsäuren hängen von der Kettenlänge sowie der Anzahl, Position und Konfiguration der Doppelbindungen ab. So nimmt die Löslichkeit in Wasser mit Zunahme der C-Atome und Abnahme der Doppelbindungen ab. Der Schmelzpunkt wird stark durch den Grad der Sättigung beeinflusst. Gesättigte Fettsäuren sind aufgrund der freien Drehbarkeit um die C-C Bindung flexible Moleküle. Dies erlaubt eine dichte Packung. Durch die Einführung einer Doppelbindung nimmt diese Flexibilität und damit die Packungsdichte ab. Es kommt zu verringerten van-der-Waals-Kräften. Der Schmelzpunkt nimmt ab.

Zur Kennzeichnung der Fettsäuren verwendet man oft eine vereinfachte Nomenklatur, in der die erste Ziffer die Kettenlänge darstellt. Die zweite Ziffer, getrennt durch einen Doppelpunkt, gibt die Anzahl der Doppelbindungen an, deren Positionsangabe sich in Klammern anschließt. Den chemischen Nomenklaturregeln entsprechend werden die Doppelbindungen vom Carboxylende her gezählt. Das die Carboxylgruppe tragende C-Atom ist C-Atom 1. Daneben gibt es eine Nomenklatur, bei der der Kohlenstoff der endständigen Methylgruppe mit Omega (Ω) gekennzeichnet wird. Die erste Doppelbindung, vom Molekülende her gezählt, wird durch den Zusatz Omega angegeben. Linolsäure, (Z,Z)-9,12-Octadecadiensäure, kann man entsprechend als 18:2 (9,12) oder Omega-6-Fettsäure bezeichnen.

Ungesättigte Fettsäuren werden aufgrund der Lage der ersten Doppelbindung, vom Methylende betrachtet, in Familien eingeteilt. Die Fettsäurefamilien haben die ungesättigten Fettsäuren Ölsäure (18:1, Omega-9), Palmitoleinsäure (16:1, Omega-7), Linolsäure (18:2, Omega-6) und Linolensäure (18:3, Omega-3) als Ursprungssubstanzen. Die Desaturasen (= Enzyme, die Doppelbindungen in Fettsäuren

einfügen) tierischer Zellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie Doppelbindungen nur zwischen der Carboxylgruppe und dem C-Atom 9 von Fettsäuren erzeugen können. Linolsäure und Linolensäure sind deshalb für den Menschen essentiell, da sie nicht vom Körper synthetisiert werden können und mit der Nahrung zugeführt werden müssen. Durch Einführung einer Doppelbindung (Desaturation) und Kettenverlängerung (Elongation) können die anderen Fettsäuren der n-6 und n-3 Familien gebildet werden. Allerdings hemmen sich die beiden Fettsäuren gegenseitig kompetitiv, da sie die gleichen Enzymsysteme benutzen. Dabei ist zwar die Affinität von α -Linolensäure (ALA) zur Δ -6-Desaturase größer, allerdings kommt Linolsäure in wesentlich größerem Maße in der Nahrung vor. Die Bildung von Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) aus ALA erfolgt nur zu etwa 10-15 % im Körper [113]. Omega-9 Fettsäuren können aus den anderen ungesättigten Fettsäuren synthetisiert werden [114] (siehe Abb. 5).

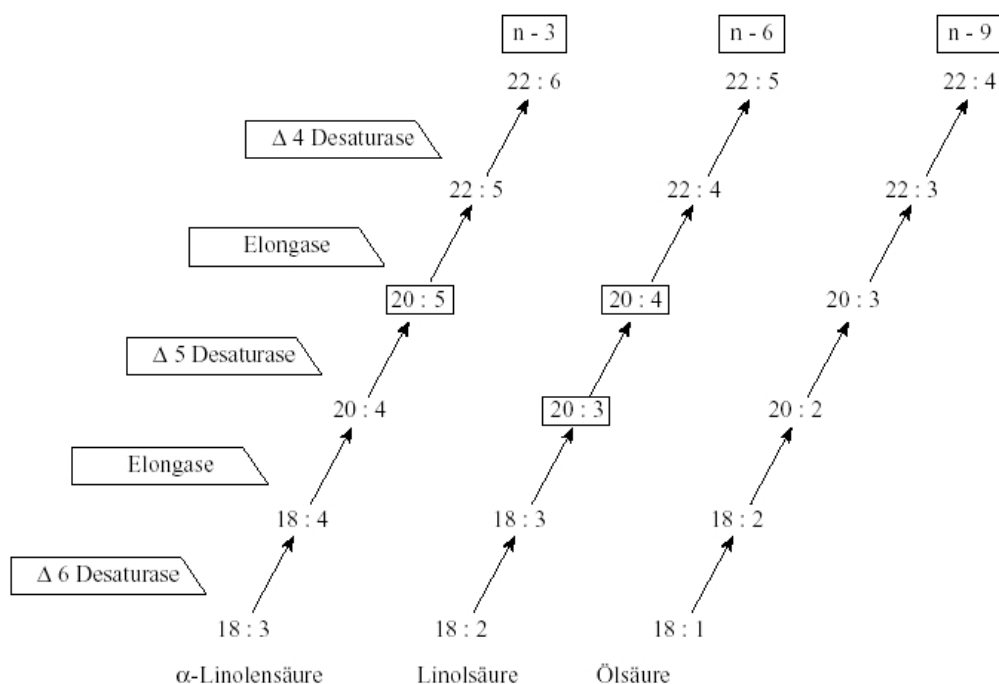


Abbildung 5: Bildung langkettiger, ungesättigter Fettsäuren. Die Affinität zur Delta 6 Desaturase nimmt von links nach rechts ab. (modifiziert nach Wolfram, [115])

Als Bausteine von Lipiden sind Fettsäuren an einer Vielzahl von Funktionen beteiligt. Triacylglyceride (Triester von Fettsäuren mit Glycerin) sind wichtig als Energiespeicher und Wärmeisolatoren. Hochungesättigte Fettsäuren dienen als Ausgangssubstanzen für

die Eicosanoidsynthese. Phospholipide (Phosphatester von Glycerin oder Sphingosin) sind entscheidend für den Aufbau der Zellmembranen [116-122].

Die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide in verschiedenen Zellmembranen wird durch die Nahrung beeinflusst [123,124]. Zwischen dem Fettsäuremuster der Zellmembran und verschiedenen vaskulären Erkrankungen wird ein Zusammenhang diskutiert [125-127].

5.2 Fettsäuren und kardiovaskuläre Erkrankung

5.2.1 Einfluss von Omega-9 Fettsäuren

Die am häufigsten in Nahrungsmitteln vorkommende Omega-9 Fettsäure ist Ölsäure, eine einfach ungesättigte Fettsäure (MUFA), die in großen Anteilen in Olivenöl, Rapsöl, Haselnüssen und Avocados vorkommt [128]. Ihr Anteil im Olivenöl liegt bei 55 - 85 % [129]. Olivenöl wird traditionell in den dem Mittelmeer angrenzenden Ländern häufiger konsumiert. Hier liegt der Anteil des konsumierten Olivenöls, bezogen auf die prozentuale Gesamtmenge der aufgenommenen Kalorien, bei 25 – 40 % [129].

In der Seven Countries Studie wurde erstmals entdeckt, daß die Prävalenz für kardiovaskuläre Erkrankungen in bestimmten Mittelmeergegenden (Korfu und Kreta) 2-3 Mal geringer ist als in den USA und Europa [130]. Die Lyon Heart Studie, welche den Effekt einer mediterranen Ernährung, ähnlich der der Bevölkerung Kretas, untersuchte, zeigte deutliche kardioprotektive Wirksamkeit [131,132]. Auch die Nurses` Health Studie zeigte, dass die Einnahme von MUFAs vor koronarer Herzkrankheit schützt [133].

MUFAs, wenn sie als Ersatz für gesättigte Fettsäuren verwendet werden, senken den LDL-Cholesterin, den Gesamtcholesterin und Triacylglycerin Spiegel, während sie gleichzeitig den HDL Spiegel steigern [134-136]. Dabei zeigt sich, dass eine Senkung des Cholesterinspiegels das Risiko einer Arteriosklerose und damit das Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen verringert [137]. Zusätzlich zeigen Studien, dass LDL-Cholesterin von Probanden, die sich reich an Olivenöl ernährt haben, weniger leicht oxidierbar ist. Dies gilt sowohl im Vergleich zu einer kohlenhydratreichen Ernährung, als auch im Vergleich zu einer Ernährung, die reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) war [138-140]. Oxidierte LDLs werden über Scavengerrezeptoren in Makrophagen aufgenommen, die sich bei einem Überschuß zu Schaumzellen umwandeln. Dies stellt einen frühen Schritt zur Bildung von Arteriosklerose dar [141].

Es gibt nur eine begrenzte Anzahl von Hinweisen, daß MUFAs einen direkten Einfluß auf Parameter der Blutgerinnung haben. Eine verringerte Plättchenaggregation und eine gesteigerte Fibrinolyse über eine Senkung des Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 Spiegels wird widersprüchlich diskutiert [142,143].

Eine Erhöhung des Faktor VII korreliert wahrscheinlich mit der Gesamtmenge an konsumierten Fett und nicht mit der Zusammensetzung der Fettsäuren [142].

5.2.2 Einfluss von Omega-6 Fettsäuren

Linolsäure, (Z,Z)-9,12-Octadecadiensäure, ist eine zweifach ungesättigte Fettsäure und die am meisten in der Nahrung vorkommende Omega-6 Fettsäure. Sie stellt die mengenmäßig dominierende Fettsäure in Pflanzenölen dar. So kommt sie zu einem großen Anteil in Sonnenblumenöl vor [117]. Omega-6 Fettsäuren sind essentiell für die Membranfunktion und die Eicosanoidbildung. Die Wirkung von Omega-6 Fettsäuren auf den menschlichen Organismus kann nicht unabhängig von Omega-9 Fettsäuren bewertet werden. Beide Fettsäuren verdrängen sich gegenseitig aus der Zellmembran. In der Eicosanoid Synthese konkurrieren beide Fettsäuren um die gleichen Enzymsysteme. Je nach Fettsäureart entstehen unterschiedliche Metaboliten mit zum Teil gegenteiliger Wirkung [144,145].

Das Verhältnis von Omega-6 zu Omega-3 Fettsäuren in den Phospholipiden der Thrombozyten wird deshalb als Risikomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen diskutiert. Es liegt in Europa bei 50:1, in Japan bei 12:1 und in Grönland bei 1:1. Dabei ist die Todesrate an kardiovaskulären Erkrankungen um so höher, je höher das Verhältnis ist [146].

Linolsäure, als Ersatz für gesättigte Fettsäuren, senkt den Gesamtcholesterol und den LDL-Cholesterolspiegel und zwar stärker als Ölsäure [147,148]. Als möglicher Mechanismus wird angenommen, dass Linolsäure den überwiegend in der Leber lokalisierten LDL Rezeptor aktiviert und es so zu einer vermehrten Clearance von LDL kommt [149-151]. In einer Studie wurde eine inverse Assoziation zwischen dem Serumspiegel an Linolsäure und dem Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, gefunden [152]. In der Nurses` Health Studie wurde entdeckt, dass das relative Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse in der Gruppe des höchsten Konsums an Linolsäure (6,4 % der Energie) um 32 % reduziert war [133]. Es wird vermutet, dass Linolsäure nur in

Ländern mit einem geringen Konsum an ungesättigten Fettsäuren das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse senkt [153].

Unter Einnahme von Linolsäure kommt es zu einer erhöhten Anfälligkeit von oxidativen Veränderungen der LDL [154,155]. Weiterhin führt Linolsäure zu einer Aktivierung des Endothels durch vermehrte Bildung von Adhäsionsmolekülen (über nuclear factor κ B), die die Adhäsion von Monozyten zur Folge hat [56,57]. Dies stellt einen Teilschritt zur Ausbildung einer Arteriosklerose dar.

5.2.3 Einfluss von Omega-3 Fettsäuren

Zu den wichtigsten Omega-3 Fettsäuren gehören die α -Linolensäure, Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA). Die α -Linolensäure kommt zu großen Anteilen in Leinöl vor und bildet die Vorstufe für EPA und DHA. EPA und DHA kommen zu großen Anteilen in fettreichen Fischen wie Hering, Lachs und Makrele vor [158].

Mitte der 70er Jahre vermuteten Dyerberg und Bang erstmalig einen Zusammenhang zwischen dem hohen Konsum an Omega-3 Fettsäuren und der niedrigen Sterblichkeit an koronarer Herzkrankheit unter den Inuit in Grönland [159,160]. In der DART Studie wurden 2033 Männer untersucht, die kürzlich einen Myokardinfarkt hatten. In der Gruppe, die angewiesen wurde Fisch zu essen, wurde eine 29%ige Reduktion der Mortalität festgestellt [161]. Die GISSI Studie konnte zeigen, daß bei Patienten, die einen Myokardinfarkt erlitten, durch die Einnahme von 850 mg Omega-3 Fettsäuren eine Reduktion der kardiovaskulären Mortalität um 30% erzielt werden konnte [162]. Allerdings gibt es zur Wirksamkeit von Fischölkapseln auch gegenteilige Studien [163]. Insgesamt scheinen Omega-3 Fettsäuren die Sterblichkeit an koronarer Herzkrankheit in Bevölkerungen mit einem erhöhten Risiko zu verringern [164].

Die genauen Mechanismen für die Wirkung von Omega-3 Fettsäuren sind unklar, allerdings tragen wahrscheinlich verschiedene Effekte dazu bei.

Die Einnahme von Omega-3 Fettsäuren führt zu einer Reduktion des Triglyceridspiegels, einem wichtigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. Eine Einnahme von 5 g/Tag kann den Triglyceridspiegel um bis zu 50 % senken [165]. Freie Omega-3 Fettsäuren wirken antiarrhythmisch. Sie lagern sich in die Zellmembran von Herzmyozyten ein und modulieren den spannungsabhängigen Natriumkanal, sowie den spannungsabhängigen Calciumkanal vom L-Typ. Dadurch wird die Erregbarkeit

verringert und die Refraktionszeit verlängert. Dies führt zu einer elektrischen Stabilisierung [166,167].

Eine erhöhte Aufnahme von Omega 3 Fettsäuren führt zu einer teilweisen Verdrängung von Arachidonsäure (einer Omega-6 Fettsäure) aus den Phospholipiden der Zellmembran. Kommt es zu einer Freisetzung der Fettsäuren aus der Zellmembran, werden diese durch die Enzyme Cyclooxygenase und Lipoxygenase in die entsprechenden Eicosanoide umgewandelt. Aus Arachidonsäure bilden sich sich Eicosanoide der 2er und 4er Serie, wie Thromboxan A2, welches eine gefäßverengende und thrombozytenaggregationsfördernde Wirkung besitzt, sowie Leukotrien B4, einem Entzündungsmediator. Die aus EPA gebildeten Thromboxan A3, sowie Leukotrien B5 sind wesentlich schwächer wirksam [145,168].

Die Stabilisierung der arteriosklerotischen Plaque [169], eine blutdrucksenkende Wirkung bei Hypertonie [170,171], eine Steigerung der Produktion von Stickstoffoxid [172] sind weitere kardiovaskulär protektive Wirkungen von Omega-3 Fettsäuren.

Die Effekte von Omega-3 Fettsäuren auf Parameter der Blutgerinnung sind weitgehend unklar oder widersprüchlich. Es gibt Hinweise auf eine Erhöhung von Protein C durch Linolensäure [173]. Eine Studie zeigt, dass die Einnahme von Omega-3 Fettsäuren zu einer Reduktion des von Willebrand Faktors und Thrombomodulin führt [174]. Andere Studien hingegen haben weder einen Effekt von Omega-3 Fettsäuren auf den Titer des von Willebrand Faktors, noch auf Faktor VII oder Fibrinogen finden können [175].

5.2.4 Einfluss gesättigter und Trans-Fettsäuren

Gesättigte Fettsäuren der Kettenlänge 12-16 haben einen LDL Cholesterinspiegel steigernden Effekt durch eine Regulierung des hepatischen LDL Rezeptors [150]. Dabei heben gesättigte Fettsäuren die LDL-Cholesterinkonzentration im Plasma doppelt so stark an, wie mehrfach ungesättigte Fettsäuren sie senken [115].

Trans-Fettsäuren entstehen bei der Hydrierung von Ölen, sowie durch Bakterien in Wiederkäuern und kommen entsprechend in Fleisch und Produkten vor, die aus hydriertem Fett hergestellt werden. Trans-Fettsäuren führen ebenfalls zu einem gesteigerten LDL Cholesterinspiegel, senken aber zusätzlich auch den HDL Spiegel [176].

5.3 Analytik von Fettsäuren

Die Analytik von Fettsäuren wird hauptsächlich durch zwei ihrer physikochemischen Eigenschaften erschwert. Fettsäuren sind in wässrigen Lösungsmitteln relativ schwer löslich und die nicht konjugierten Fettsäuren haben einen niedrigen Absorptionskoeffizienten [177].

Der erste Schritt in der Analytik von Fettsäuren besteht in der Isolierung aus ihrer Matrix. Die zwei verbreitetsten Lösungsmittlextraktionsmethoden sind die nach Folch (Extraktion mit Chloroform/Methanol) und die Variante nach Bligh und Dyer (Chloroform/Methanol/Wasser) zur Extraktion der Gesamtlipide [178]. Daneben findet die Methode nach Hara (Extraktion mit Hexan/Isopropanol) Verwendung, die den Vorteil hat, weniger toxisch zu sein [179]. Zur gezielten Extraktion von Fettsäuren aus dem Blutplasma sind die Methoden nach Miles (Chloroform/Heptan/Methanol/Salzsäure) und die modifizierte Dole Methode (Isopropanol/Heptan/Phosphorsäure) gebräuchlich [180]. Allen diesen Methoden ist gemeinsam, dass sie eine Mischung aus polarem und unpolarem Lösungsmittel enthalten.

Gas Chromatographie (GC), allein oder in Kombination mit vorheriger Aufreinigung durch Dünnschichtchromatographie, stellt die übliche Methode zur Quantifizierung von Fettsäuren dar. Allerdings hat diese Methode einige Nachteile gegenüber der HPLC, wie eine mögliche thermische Modifizierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, sowie die Zerstörung der Proben bei den in der GC üblichen Detektoren [181].

Die Derivatisierung von Fettsäuren wird durchgeführt, um die Empfindlichkeit ihrer Detektion zu erhöhen, ihre Flüchtigkeit zu erhöhen und um ihre Trennung zu verbessern [182]. UV sensitive Derivate wie Phenacyl ester oder Fluoreszenzderivate vom Cumarintyp werden in der HPLC verwendet, um die Empfindlichkeit der Detektion zu erhöhen [183]. Die Bildung von Fettsäuremethylestern (FAME) stellt die übliche Derivatisierungsreaktion für Fettsäuren vor der gaschromatographischen Analyse dar und erhöht die Flüchtigkeit der Fettsäuren. Zur Herstellung der FAME gibt es eine große Anzahl an Methoden, unter denen die Verwendung von Methanol mit HCl oder Bortrifluorid als Katalysator verbreitet ist [184]. Eine dritte Gruppe verbreiteter Derivatisierungsreaktionen stellt die Bildung von Picolinyl, 4,4-Dimethyl-oxazolin (DMOX) oder Pyrrolidid Derivaten für die massenspektrometrische Bestimmung dar. Diese Derivate erlauben die eindeutige Lokalisierung der Doppelbindung durch

unverwechselbare Fragmentierungsmuster [185,186]. Im Gegensatz zu diesen Remote-site Derivatisierungen, bei denen die Carboxylgruppe derivatisiert wird, wird bei den On-site Derivatisierungen die Doppelbindung derivatisiert. Dies ermöglicht gleichermaßen die Lokalisation der Doppelbindung durch das Fragmentierungsmuster [187].

Silber-Ionen bilden schwache, reversible Charge Transfer Komplexe mit ungesättigten organischen Verbindungen. Dadurch ist es möglich Fettsäuren nach Anzahl, Konfiguration und Lokalisation ihrer Doppelbindungen zu trennen [188,189]. Silberionenchromatographie (HPLC oder DC) ist deshalb besonders geeignet zur Trennung von Fettsäureisomeren. Im Gegensatz dazu wird Normalphasen DC hauptsächlich zur Trennung von Fettsäureklassen und damit in Kombination mit GC und HPLC verwendet [190].

6 Bearbeitete Arzneidrogen

6.1 Cortex Cinnamomi

Cinnamomum ceylanicum Bl. (syn. *C. verum* J. S. Presl), Ceylon-Zimtbaum, gehört zur Familie der Lauraceae. Es handelt sich um einen 6 – 12 m hohen, immergrünen Baum, welcher vor allem in Sri Lanka und Südostasien kultiviert wird. Verwendet wird die Rinde (*Cortex Cinnamomi*), welche vom äußeren Kork und dem darunter liegenden Parenchym befreit wurde. Die Hauptinhaltsstoffe sind 0,5 – 4 % ätherisches Öl (mit der Hauptkomponente Zimtaldehyd), Diterpene (wie Cinnzeylanol, Cinnzeylanin) und kondensierte Gerbstoffe (bis zu 2 %). Zimt wirkt antibakteriell, fungistatisch und motilitätsfördernd. Die Diterpene wirken insektizid. Ein wässriger Zimtextrakt verbesserte die Durchblutung der Magenschleimhaut und erhöhte die Produktion von Mukus [191]. Angewendet wird Zimt bei Appetitlosigkeit und dyspeptischen Beschwerden [192,193].

Seit 2004 findet Diabetes als Indikation für die Verwendung von Zimt breites Interesse [194]. Die Aufnahme von 1- 6 g gepulverter Rinde von *Cinnamomum cassia* senkte bei Typ 2 Diabetikern den Blutglucosespiegel nach 60 Tagen um bis zu 29 % [195,196]. Zimt führte bei Ratten zu einer Erhöhung des Insulinspiegels sowie zur Abnahme des Glucosespiegels während eines Glucose Toleranz Tests. *Cinnamomum cassia* war dabei *Cinnamomum ceylanicum* überlegen [197]. Es wird vermutet, daß die im Zimt enthaltenen Polyphenole wirksamkeitsbestimmend sind [198].

6.2 Herba Adonidis

Adonis vernalis L., Adonisröschen, gehört zur Familie der Ranunculaceae. Die Pflanze ist 10 – 40 cm hoch und wird überwiegend in Bulgarien, Rußland und Ungarn kultiviert. Verwendet wird das Kraut (*Herba Adonidis*), welches in der Blütezeit gesammelt wird. Die Droge enthält 0,2 – 0,8 % herzwirksame Glykoside vom Cardenolidtyp, vor allem Adonitoxigenin- und Strophanthidinglykoside (z.B. Cymarín), sowie 1 % Flavonoide mit der Hauptkomponente Adonivernith. Die Droge wirkt positiv inotrop und venokonstriktorisch und wird bei Herzinsuffizienz (Grad I – II NYHA), besonders mit nervöser Begleitsymptomatik, verwendet [192,199,200].

6.3 Semen Erucae

Sinapis alba L., weißer Senf, gehört zur Familie der Brassicaceae. Die einjährige Pflanze ist 20 – 60 cm hoch und trägt eine 2 –4 cm lange Schote als Frucht, welche die bräunlichen bis weißlichen Samen enthält. Die Pflanze wird in Nordamerika und Nord- und Westeuropa angebaut, kommt aber auch in Sibirien und Ostasien vor. Verwendet werden die Samen (Semen Erucae). Die Droge enthält Glucosinolate. Hauptglucosinolat ist Sinalbin, aus welchem in Gegenwart von Wasser durch das Enzym Myrosinase das nichtflüchtige Sinalbin-Senföl p-Hydroxybenzylsenföl entsteht. Daneben enthält die Droge 20 – 35 % fette Öle mit einem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren (v.a. Erucasäure), Eiweißstoffe (ca. 40 %) und Phenylpropanderivate (v.a. Sinapin). Die Droge wirkt antibakteriell, hautreizend und hyperämisierend. Die Droge findet äußerlich Verwendung bei Katarrhen der Atemwege, Weichteilrheumatismus sowie chronisch-degenerativen Gelenkerkrankungen [192,201-203].

6.4 Flores Sambuci

Sambucus nigra L., Holunder, gehört zur Familie der Caprifoliaceae. Die Pflanze ist ein bis zu 7 m hoher Strauch oder Baum. Die gelblichweißen Blüten bilden Trugdolden mit 5 Hauptästen. Verwendet werden unter anderem die getrockneten Blüten (Flores Sambuci). Die Droge enthält bis 3 % Flavonoide, ätherisches Öl, Sterole und Triterpene. Der Tee führt zu einer Steigerung der Bronchialsekretion und wird bei Katarrhen der Atemwege sowie bei trockenem Reizhusten verwendet. Zu der volksmedizinisch genutzten schweißtreibenden Wirkung zur Behandlung von fieberhaften Erkältungskrankheiten liegen keine Untersuchungen vor [192,201,204].

7 Screening von 78 Arzneidrogen auf ihre Thrombin hemmende Wirkung

7.1 Einleitung

Naturstoffe sind eine traditionell wichtige Quelle für neue Arzneistoffe. Innerhalb der Gruppe der Naturstoffe bieten höhere Pflanzen eine Reihe von Vorteilen, von denen die Möglichkeit des einfachen Upscalings ein wesentlicher Punkt ist [25]. Dies umfasst auch die korrekte und eindeutige Identifizierung, sowie die Sicherung der Logistik.

Obwohl Naturstoffe innerhalb der Gruppe der Antikoagulantien sehr verbreitet sind, ist die Anzahl der publizierten Naturstoffscreenings, die auf eine Hemmwirkung von Thrombin testen, überschaubar [205-207]. Keines dieser Screenings enthält Eliminationsschritte. Der Vergleich der Inhibition von Thrombin mit der von Trypsin ist für Pflanzen unzweckmäßig, da die in Pflanzen häufig vorkommende Gerbstoffe mit dem zur Aktivierung von Trypsin notwendigen Calcium Komplexe bilden [208]. Die Konsequenz ist eine „Selektivität“, die durch die Bindung der Gerbstoffe zustande kommt.

Ziel dieses Screenings war die Auffindung von niedermolekularen Pflanzeninhaltsstoffen, die Thrombin hemmen. In einem ersten Eliminationsschritt sollten Gerbstoffe gefällt werden. Die Entwicklung der dazu verwendeten Fällungsmethode wird in Kapitel 8 beschrieben. Auch wenn die Entfernung von Gerbstoffen zweifelhaft ist [209], wurde dieser Schritt unternommen, da Proteine bekanntermaßen sehr reaktiv gegenüber Gerbstoffen sind und Gerbstoffe als Leitstrukturen ungeeignet sind. In einem nächsten Schritt sollten wasserlösliche, makromolekulare Thrombininhibitoren, wie Polysaccharide und Peptide, per Größenausschlußchromatographie eliminiert werden. Ziel der letzten Stufe war es, auf sogenannte „promiscuous“ Inhibitoren [210] zu prüfen. Abbildung 6 zeigt die Übersicht der Vorgehensweise.

Die Zusammenstellung der Pflanzenbibliothek erfolgte durch eine zufällige Auswahl von Drogen aus dem Caelo Katalog 2003. Herzglykosiddrogen und Alkaloiddrogen sind mangels Angebot entsprechend unterrepräsentiert. Desweiteren wurde weitgehend auf Foliadroge verzichtet, da Chlorophyll a im Bereich 400-430 nm stark absorbiert. Da der entstehende Farbstoff unseres Testsystems bei 405 nm absorbiert, wird der Fehler

des Lambert Beerschen Gesetzes bei zu hohen absoluten Absorptionen zu hoch. Eine zu verdünnte Lösung des Drogenextraktes wäre wiederum zu unempfindlich.

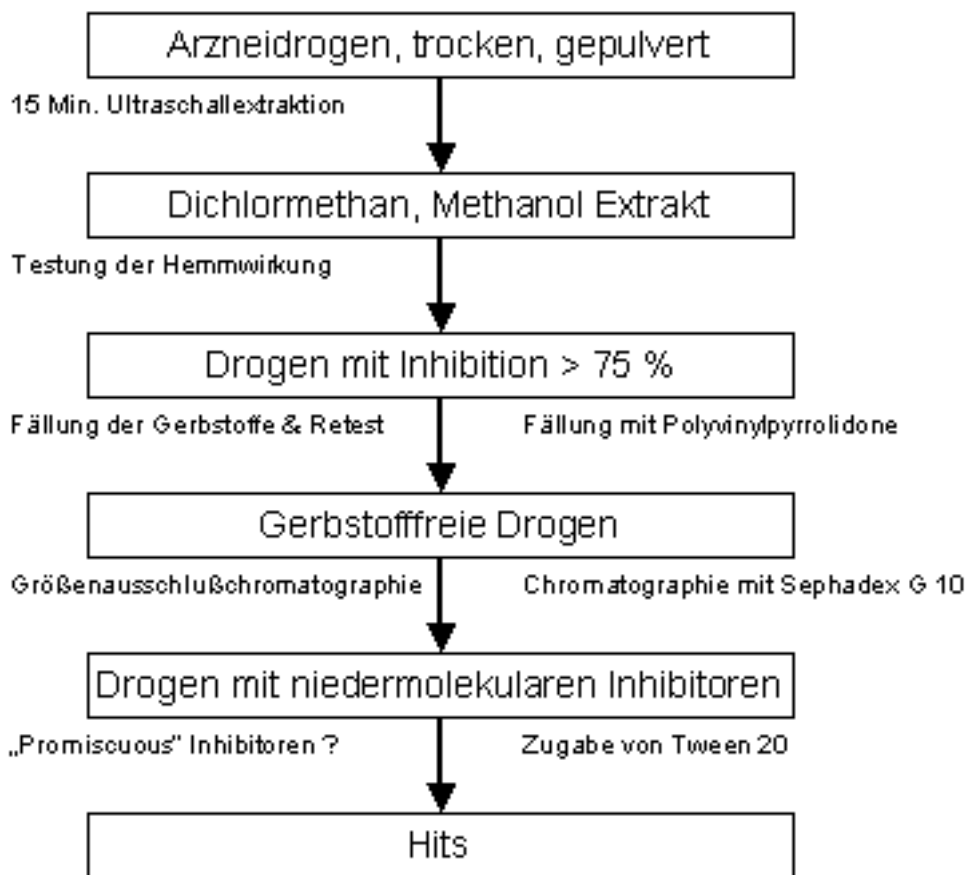


Abbildung 6: Übersicht über die Vorgehensweise beim Screening

7.2 Verwendetes Testsystem

Als Testsystem wurde ein amidolytischer Assay verwendet mit Chromozym TH (Tosylglycyl-prolyl-arginin-4-nitronilacetat) als Substrat für Thrombin. Das Prinzip des Testsystems beruht auf der Spaltung des Substrats durch Thrombin und der Freisetzung von p-Nitroanilin, welches bei 405 nm absorbiert. Die Zunahme der Absorption mit der Zeit wird photometrisch detektiert. Durch Vergleich des linearen Anfangsteil der Absorptionzunahme zwischen der Lösung mit dem Inhibitor und dem Blindwert wird die Inhibition berechnet (siehe Kapitel 2 des experimentellen Teils).

7.3 Extraktion und erste Testserie

Von den Drogen wurden sowohl Methanol- als auch Dichlormethanextrakte hergestellt. Die Inhaltsstoffe der Methanol Extrakte zeichnen sich durch ein breites Polaritätsspektrum aus, während die Dichlormethanextrakte vor allem lipophile Inhaltstoffe enthalten. Aufgrund der statistischen Analyse vorhandener Arzneistoffe zeigt sich, dass eine erhöhte Lipophilie eine wünschenswerte Eigenschaft eines Arzneistoffes ist [211].

Die hergestellten Extrakte wurden in der Konzentration 1 mg/ml auf ihre Thrombin hemmende Wirkung untersucht. Da nicht alle Drogen mit dem gewählten Extraktionsverfahren eine ausreichende Menge an Extrakt lieferten, wurden insgesamt 148 Extrakte getestet. Die Drogen sowie ihre Hemmwirkung sind im experimentellen Teil aufgeführt (siehe dazu 3.2 im experimentellen Teil). Die Anzahl der Drogen pro Hemmbereich wird in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Anzahl der Drogen pro Hemmbereich

	Methanolextrakte	Dichlormethanextrakte
Hemmung > 75 %	14	11
Hemmung 50 - 75 %	17	14
Hemmung 25 - 50 %	23	25
Hemmung < 25 %	22	22

25 Drogen, dies entspricht 17 %, zeigten in dieser ersten Testserie eine Thrombinhemmung von mehr als 75 %. Diese Drogen wurden für die nächste Testreihe ausgewählt. Die Grenze von 75 % wurde willkürlich gewählt.

Die Drogen, die eine Hemmung von mehr als 75 % zeigten, sind in Tabelle 2 dargestellt. Bei den insgesamt 3 Drogen Fructus Anisi, Semen Erucae und Fructus Sabalae zeigten sowohl der Methanolextrakt als auch der Dichlormethanextrakt eine Hemmung von mehr als 75 %.

Tabelle 2: Drogen mit einer Thrombinhemmung von mehr als 75 %

Nr.	Droge	Methanolextrakte			Dichlormethanextrakte		
		Hemmung (%)			Hemmung (%)		
1	Herba Ephedrae	88,8	+/-	0,7	21,9	+/-	0,2
6	Herba Adonidis vernalis	54,9	+/-	19,5	98,4	+/-	2,6
8	Fructus Cardamomi excortic.	77,5	+/-	13,5	67,3	+/-	4,0
13	Fructus Anisi	78,6	+/-	2,4	78,5	+/-	1,1
14	Fructus Foeniculi amari	77,7	+/-	8,0	68,0	+/-	1,4
15	Semen Erucae	75,4	+/-	0,9	75,1	+/-	1,2
20	Radix Liquiritiae mundat.	78,1	+/-	2,1	29,8	+/-	32,7
22	Semen Arecae	96,1	+/-	1,3	32,4	+/-	0,2
24	Rhizoma Tormentillae	83,0	+/-	4,0	21,4	+/-	0,8
28	Cortex Cinnamomi chinens.	83,0	+/-	2,7	48,0	+/-	1,8
30	Radix Althaeae mundat.	10,0	+/-	2,9	79,2	+/-	8,2
41	Flores Sambuci	19,2	+/-	3,2	77,5	+/-	10,0
42	Fructus Coriandri	62,0	+/-	2,3	78,1	+/-	0,6
43	Fructus Carvi	69,5	+/-	2,6	79,4	+/-	0,0
44	Lichen islandicus	80,8	+/-	1,2	47,3	+/-	1,8
55	Flores Tiliae	92,1	+/-	0,9	49,5	+/-	3,2
56	Herba Hydrocotylis asiaticae	35,6	+/-	0,9	95,1	+/-	3,4
59	Herba Euphrasiae	33,2	+/-	2,7	83,0	+/-	4,7
63	Radix Levistici	13,4	+/-	1,4	77,0	+/-	2,8
65	Cortex Salicis	76,4	+/-	1,2	32,1	+/-	0,8
69	Fructus Sabalae serrulatae	75,3	+/-	5,5	86,0	+/-	8,8
74	Cortex Cinnamomi ceylanici	87,4	+/-	0,2	27,5	+/-	1,3

7.4 Fällung von Gerbstoffen und erneute Testung

Ziel dieses Schrittes war es, die Hemmung von Thrombin ausschließlich durch Gerbstoffe auszuschließen. Dazu wurde eine Polyvinylpyrrolidon-Lösung (PVP-Lösung) zu den in Testbedingungen gelösten Extrakten gegeben, um die Gerbstoffe zu fällen.

Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut auf Thrombin inhibierende Wirkung getestet. Parallel dazu wurden die Extrakte, zu denen Wasser statt des Fällungsreagenzes hinzugegeben wurde, getestet. Aufgrund des Vergleiches der Hemmwirkung mit und ohne Gerbstofffällung wurde entschieden, welche Drogen weiter untersucht wurden. Dieser Schritt diente gleichermaßen der Überprüfung der ersten Serie. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung (Abb. 7) dargestellt.

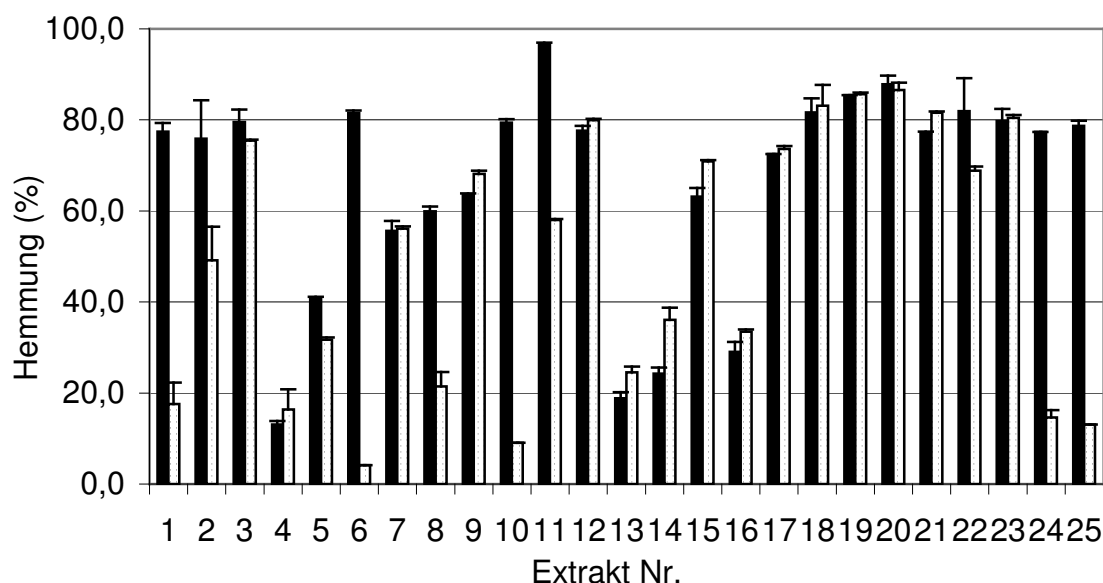


Abbildung 7: Die schwarzen Balken stellen die Inhibition nach Zugabe von Wasser dar, die weißen Balken die Inhibition nach Zugabe von PVP Fällungsreagenz. Die Werte im Detail, sowie die den Nummern zugehörigen Extrakte sind im experimentellen Teil unter 3.4 aufgeführt.

Für die weiteren Tests wurden die Nummern 3 (Fructus Cardamomi, Methanol), 7 (Flores Sambuci, Dichlormethan), 9 (Herba Adonidis, Dichlormethan), 12 (Fructus Sabalae, Methanol), 15 (Radix Althaeae, Dichlormethan), 17 (Semen Erucae, Methanol), 18 (Fructus Anisi, Dichlormethan), 19 (Fructus Anisi, Methanol), 20 (Fructus Carvi, Dichlormethan), 21 (Fructus Coriandri, Dichlormethan), 22 (Fructus Foeniculi, Methanol) und 23 (Fructus Sabalae, Dichlormethan) ausgewählt.

Die Extrakte der Drogen Radix Liquiritiae (Nr. 4), Lichen Islandicus (Nr. 5), Herba Euphrasiae (Nr. 13), Radix Levistici (Nr. 14) und Herba Hydrocotylis (Nr. 16) zeigten nur eine geringe Wirksamkeit.

Die Extrakte von Rhizoma Tormentillae (Nr. 1), Semen Erucae (Nr. 2), Herba Ephedrae (Nr. 6), Cortex Salicis (Nr. 8), Flores Tiliae (Nr. 10), Semen Arecae (Nr. 11), Cortex

Cinnamomi chinensis (Nr. 24) und Cortex Cinnamomi ceylanicum (Nr. 25) zeigten eine deutliche Abnahme der inhibitorischen Wirkung durch die Zugabe des PVP Fällungsreagenz.

7.5 Größenausschlußchromatographie und Testung auf makromolekulare Inhibitoren

Peptide und Polysaccharide, die Thrombin hemmen, sind in der Literatur beschrieben. Ziel dieser Eliminationsstufe war es, diese makromolekularen Thrombininhibitoren auszuschließen. Dazu wurden PD10 Säulen (Pharmacia) mit Sephadex G 10 gepackt. Sephadex G 10 hat einen Größenausschlußbereich bis 700 g/Mol, d.h. alle Moleküle, die ein Molekulargewicht von mehr als 700 g/Mol besitzen, werden nicht retiniert. Um die Chromatographie parallel durchzuführen, wurden p-Nitroanilin (Mr 138) und Vitamin B 12 (Mr 1355) als farbige Marker zu dem Extrakt hinzugegeben. Dadurch entfiel die Verwendung eines Detektors. Die Vitamin B 12 Fraktion wurde gesammelt, zur Lösungsmittelfreiheit getrocknet, erneut gelöst und getestet. Als Blindwert wurde eine Vitamin B 12 Fraktion verwendet, die ohne Zugabe eines Extraktes getrennt wurde. Zusätzlich wurde eine Benzamidinlösung (Negativkontrolle) mit diesem Verfahren getrennt.

Abbildung 8 zeigt, dass keine makromolekulare Fraktion Thrombin hemmt. Extrakt Nr. 8, der Methanol Extrakt von Fructus Anisi führt zu einer Aktivierung von 22,8 %.

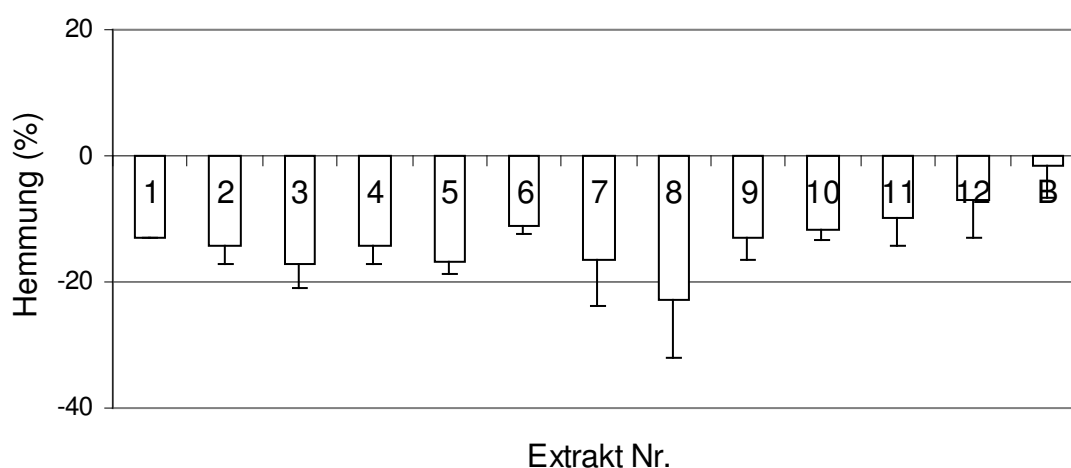


Abbildung 8: Aktivierung von Thrombin durch die makromolekularen Fraktionen. Die Werte im Detail, sowie den Nummern zugehörige Extrakte befinden sich im experimentellen Teil unter 3.6; B = Benzamidin.

7.6 Test auf „promiscuous“ Inhibitoren

Der Begriff „promiscuous“ Inhibitoren bezeichnet Inhibitoren, die sich zu Aggregaten zusammenlagern und das Zielprotein adsorbieren, oder die sich um das Zielprotein aggregieren. Es zeigte sich, dass die Zugabe von Tween-20 zu diesen Inhibitoren zu einem Verlust ihrer Wirksamkeit führt [212].

Ziel dieser Stufe war es, auf „promiscuous“ Inhibitoren zu testen, indem die Hemmung mit und ohne Zugabe von Tween-20 getestet wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

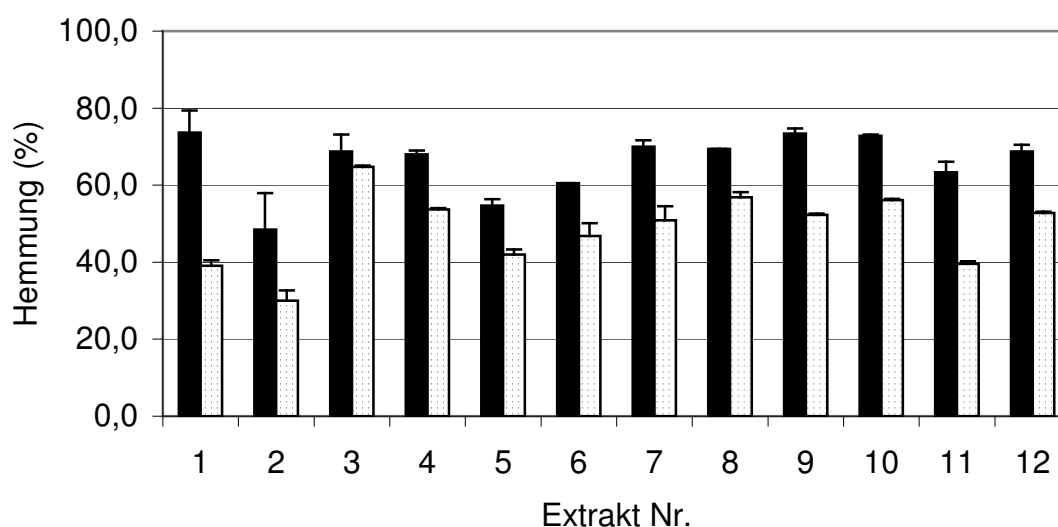


Abbildung 9: Die weißen Balken stellen die Hemmung von Thrombin nach Zugabe von Tween 20 dar, die schwarzen Balken stellen den Vergleich dar. Detaillierte Werte, sowie den Nummern zugehörige Extrakte befinden sich im experimentellen Teil unter 3.8

Bei sämtlichen Extrakten kommt es zu einer Abnahme der Hemmung durch die Zugabe von Tween 20. Am stärksten ist der Effekt für den Methanol Extrakt von Fructus Cardamomi (Nr. 1). Hier kommt es zu einer Abnahme von über 30 % (absolut). Am geringsten ist der Effekt für Dichlormethanextrakt von Herba Adonidis. Die Abnahme der Wirksamkeit beträgt hier 4 % (absolut). Bei keinem Extrakt kam es zu einem absoluten Wirkungsverlust.

7.7 Diskussion

148 Extrakte wurden auf 12 Extrakte eingegrenzt, die aufgrund des gewählten Eliminationsverfahrens für eine weitere Aufbereitung in Frage kommen. Dies entspricht 8 %. Unter den Extrakten sind 5 Methanol Extrakte (von 76 getesteten) und 7

Dichlormethanextrakte (von 72 getesteten). Damit war die Wahrscheinlichkeit eines Treffers in einem Dichlormethanextrakt in unserer Drogenauswahl erhöht.

6 der 12 wirksamsten Extrakte sind Extrakte von Drogen aus der Familie der Apiaceen. Ein gemeinsamer Inhaltsstoff ist möglicherweise der Grund für die Hemmung.

Bei 8 Extrakten reduzierte sich die Wirksamkeit mit der Fällung der Gerbstoffe. Von diesen 8 Extrakten waren 7 Methanolextrakte. Vor diesem Hintergrund ist zweifelhaft, ob die Wirkverminderung des Dichlormethanextraktes von Samen *Erucae* (Nr. 2) durch eine Fällung der Gerbstoffe zustande kommt. Aufgrund der Löslichkeiten der Gerbstoffe ist dies unwahrscheinlich. Daher scheint es sinnvoll, die Gerbstoffentfernung nur für polare bis mittelpolare Extrakte durchzuführen. Der Verlust der Aktivität nach der Entfernung der Gerbstoffen ist bei Pflanzenextrakten weit verbreitet [213,214]. Die Gerbstoffe von Samen *Areca*, *Cortex Cinnamomi*, *Herba Ephedrae* und *Rhizoma Rhei* wurden bereits als hemmendes Prinzip des Angiotensin Conversions Enzym beschrieben [215,216].

Sowohl Peptide als auch Polysaccharide wurden bereits als Protease Inhibitoren beschrieben [217-219]. Die Verwendung der Größenausschlußchromatographie zur Gewinnung von Polypeptiden und Polysacchariden ist ein gebräuchliches Verfahren [220-222]. Bei sämtlichen Extrakten führten die makromolekularen Fraktionen zu einer schwachen Aktivierung von Thrombin. Möglicherweise sind enthaltene Makromoleküle positive Effektoren für Thrombin.

Der Begriff „promiscuous“ Inhibitor beschreibt Verbindungen, die sich zu Aggregaten zusammenlagern und Zielproteine entweder durch Absorption oder Einschluß hemmen. Sie sind durch eine geringe Selektivität, eine geringe Struktur-Wirkungsbeziehung, sowie eine nichtkompetitive Hemmung charakterisiert [210]. Es wurde gezeigt, dass die Zugabe von Detergentien, wie Tween 20, zu einem Wirkverlust von „promiscuous“ Inhibitoren führt [212]. Bei sämtlichen Extrakten führte die Zugabe von Tween 20 zu einer Verminderung der Wirksamkeit. Tween 20 gehört zur Gruppe der nichtionischen Emulgatoren. Die Wirkverminderung könnte durch Assoziation von lipophilen Inhaltstoffen an Micellen erfolgt sein.

Eine Schwierigkeit bei dem Screening von Pflanzenextrakten ist, dass jeder Extrakt die Summe aus verschiedenen Substanzen darstellt. Dabei kann jede dieser Substanzen Einfluß auf das System nehmen. Zum Beispiel können Substanzen mit Säulenmaterial reagieren und so dessen Eigenschaften verändern, oder sie wirken als Emulgatoren um

den eigentlichen Inhibitor in Lösung zu bringen. Es ist deshalb nahezu unmöglich, ein allgemein gültiges, validiertes Protokoll zur Auswahl eines für die weitere Bearbeitung vielversprechenden Extraktes zu erstellen. Das hier erstellte Protokoll ist ein Vorschlag, um Extrakte zu finden, die niedermolekulare Thrombininhibitoren enthalten. Ziel war, durch verschiedene Eliminationsstufen die Möglichkeit eines falsch positiven Treffers zu verringern, so dass eine aufwendige Fraktionierung und Isolierung zu dem erwünschten Ergebnis führt.

8 Vergleich verschiedener Fällungsmethoden zur Entfernung von Gerbstoffen

8.1 Einleitung

Gerbstoffe haben die Fähigkeit, mit Proteinen zu interagieren. Da sie in vielen Pflanzen vorkommen, geben diese Pflanzen oft positive Ergebnisse in Screenings [214,215]. Gerbstoffe sind allerdings nur von geringem Interesse als Leitstruktur. Es ist daher in Screenings notwendig zu überprüfen, ob Gerbstoffe die einzigen wirksamen Verbindungen darstellen. Durch die Testung der Wirksamkeit vor und nach der Entfernung von Gerbstoffen kann diese Aussage getroffen werden [213].

Die Methoden zur Entfernung von Gerbstoffen können grob in chromatographische und Fällungsmethoden unterteilt werden. Die Verwendung von Säulen, die mit Polyamid [223], unlöslichem Polyvinylpyrrolidon, Polystyrolharz [224] und Sephadex LH 20 [71] Material gepackt wurden, erwies sich als geeignet zur Entfernung von Gerbstoffen. Als Fällungsreagenzien ist die Verwendung von Gelatine, Coffein, Kollagen, Polyvinylpyrrolidon und Bleiacetat [225,226] gebräuchlich. Da Fällungsmethoden weniger apparativen Aufwand erfordern, sind sie geeignet, um parallel in einer großen Anzahl von Proben Gerbstoffe zu entfernen.

Obwohl die Verwendung von Fällungsreagenzien ein gebräuchliches Verfahren zur Entfernung von Gerbstoffen darstellt, existieren wenig Informationen dazu, inwiefern Variationen der Fällungsbedingungen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Ziel dieser Versuchsreihe war es deshalb, den Einfluss des pH Wertes, der Konzentration des Fällungsreagenzes und der Lösungsmittel Ethanol, Methanol und Dimethylsulfoxid (DMSO) auf unterschiedliche Fällungsreagenzien zu überprüfen. Dabei wurde der Einfluss auf Polyvinylpyrrolidon, Gelatine, Coffein und Bleiacetat untersucht. Dazu wurden Gerbstoffe unter den verschiedenen Bedingungen gefällt und die Absorption des Filtrates, nach Abzentrifugation des Gerbstoff-Fällungsreagenz Komplexes und Zugabe von Eisen-(III)-chlorid zum Filtrat, gemessen.

Ein weiteres Problem war, dass es keine Angaben dazu gab, inwieweit diese Fällungsreagenzien auch andere, nicht gerbstoffartige Polyphenole mitfällen. Anhand von ausgewählten Beispielsubstanzen aus verschiedenen Phenolklassen wurde dieses Problem untersucht. Dazu wurde eine Mischung verschiedener Phenole mit den

Fällungsreagenzien gefällt. Durch Vergleich der Peakflächen der einzelnen Phenole in einem Übersichtschromatogramm, vor und nach der Fällung, wurde das Ausmaß der Fällung für die einzelnen Phenole bestimmt.

Ziel dieser Arbeit war das Auffinden von Thrombininhibitoren, so daß schließlich noch die Effektivität der Gerbstofffällungen unter Thrombintestbedingungen bestimmt wurde. Außerdem wurde noch überprüft, inwieweit die Fällungsreagenzien selber Thrombin hemmen.

Für sämtliche Versuchsreihen wurde sowohl der Einfluß von hydrolysierbaren, als auch von kondensierten Gerbstoffen bestimmt.

8.2 Bestimmung der Effektivität der Gerbstofffällung

Zur Bestimmung der Gerbstofffällung wurde die Methode von Hagerman in der microadaptierten Version verwendet [227,228].

Die hydrolysierbaren und kondensierten Gerbstoffe wurden unter den entsprechenden Bedingungen gelöst und durch Zugabe der verschiedenen Fällungsreagenzien gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert. Zu dem Überstand wurde Eisen-(III)-chlorid Lösung gegeben. Der farbige Komplex wurde bei 510 nm UV spektrometrisch vermessen. Entsprechend bedeutet eine geringe Absorption eine effektive Fällung.

8.3 Einfluß der Konzentration

Um eine Vorstellung zu gewinnen, welche Menge an Fällungsreagenz notwendig ist, um eine bestimmte Menge Gerbstoff zu fällen, wurde der Einfluß der Menge des Fällungsreagenzens auf das Ausmaß der Fällung untersucht. Abbildung 10 zeigt die Effekte für hydrolysierbare, Abbildung 11 für kondensierte Gerbstoffe.

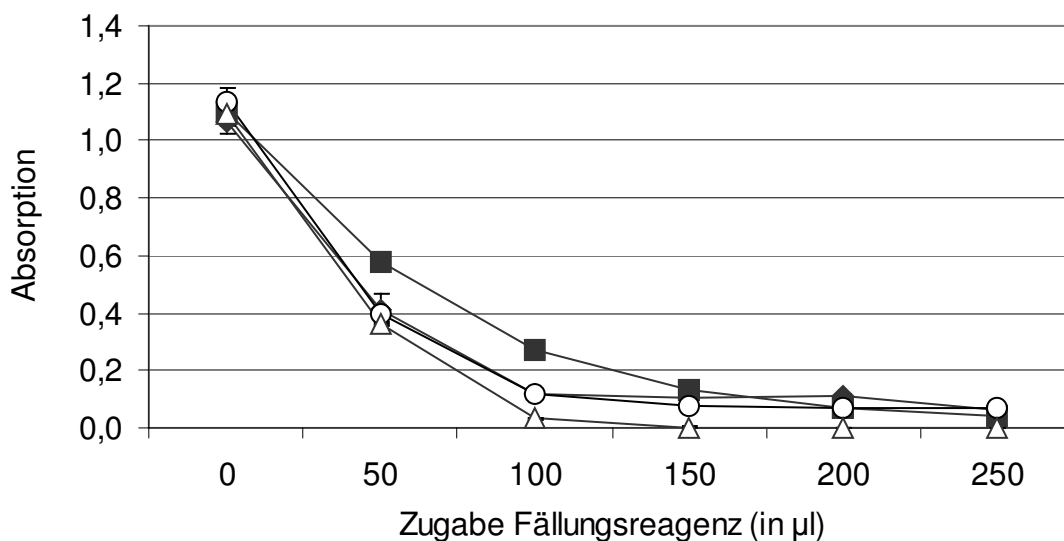


Abbildung 10: Einfluss der Menge des Fällungsreagenzes (2%) auf die Fällung von 250 µl hydrolysierbaren Gerbstoffen (1%); Gesamtvolumen 500 µl; PVP (◆), Gelatine (■), Coffein (○) und Bleiacetat (△).

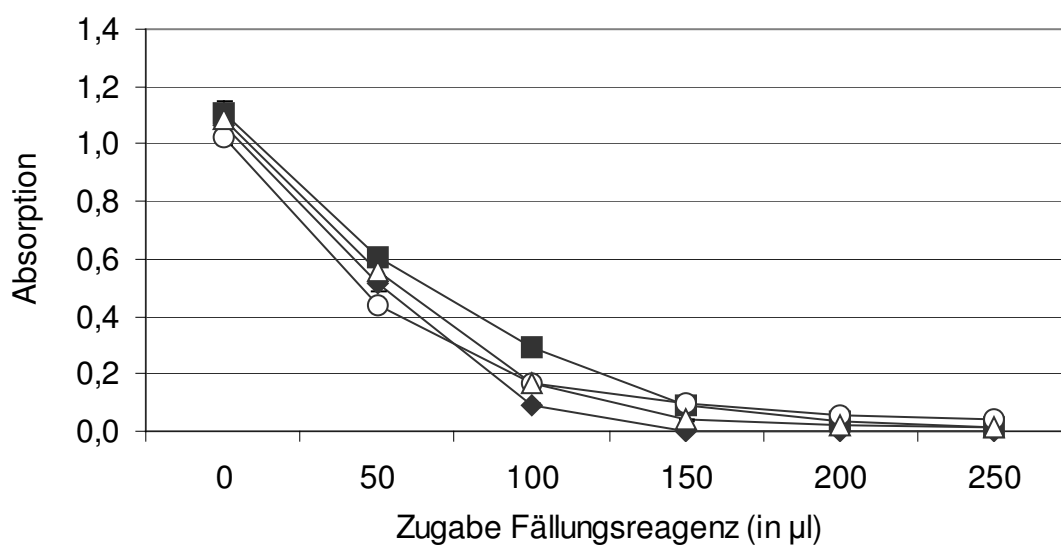


Abbildung 11: Einfluss der Menge des Fällungsreagenzes (2%) auf die Fällung von 250 µl kondensierten Gerbstoffen (1%); Gesamtvolumen 500 µl; PVP (◆), Gelatine (■), Coffein (○) und Bleiacetat (△).

Die Ergebnisse, die in Abbildung 10 und 11 dargestellt sind, zeigten keine Unterschiede zwischen kondensierten und hydrolysierbaren Gerbstoffen. Gelatine zeigte die schwächsten Fällungseigenschaften. Coffein und PVP zeigten ähnliche Fällungseigenschaften. Bleiacetat führte als einziges Fällungsreagenz zu einer vollständigen Abnahme der Absorption.

8.4 Einfluß des pH-Wertes

Aktivitätstests finden meistens im pH Optimum des Proteins statt. Aus diesem Grund sollte die Wirksamkeit der Fällungsreagenzien bei verschiedenen pH-Werten untersucht werden. In Abbildung 12 ist der Einfluß des pH-Wertes auf die Fällung von hydrolysierbaren, in Abbildung 13 ist der Einfluß des pH-Wertes auf die Fällung von kondensierten Gerbstoffen dargestellt.

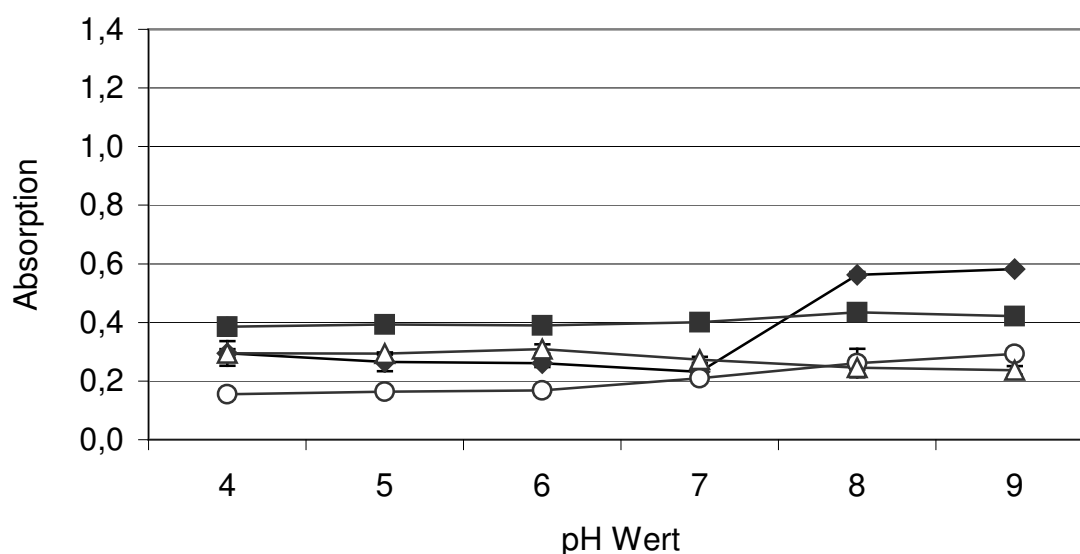


Abbildung 12: Einfluss des pH Wertes der Gerbstofflösung auf die Fällung von hydrolysierbare Gerbstoffen; PVP (◆), Gelatine (■), Coffein (○) und Bleiacetat (△).

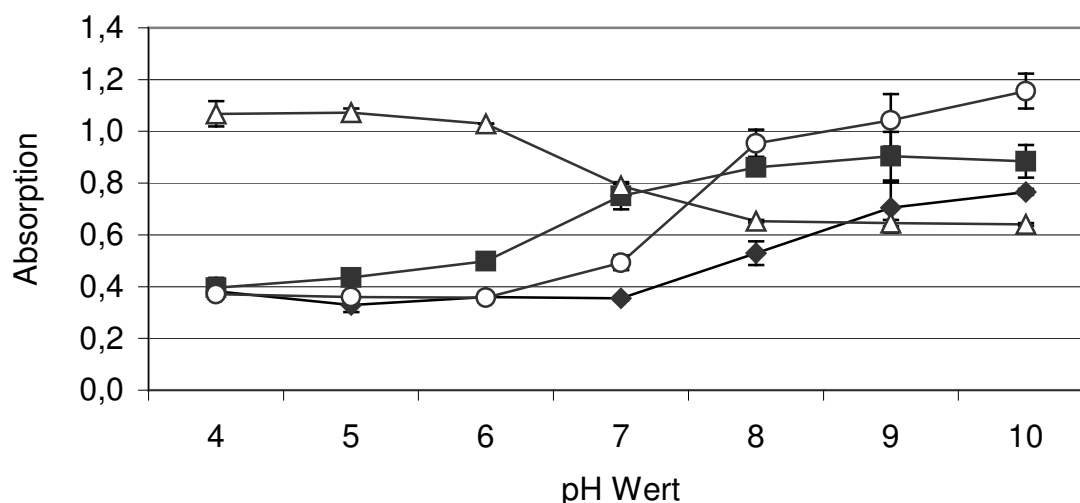


Abbildung 13: Einfluss des pH Wertes der Gerbstofflösung auf die Fällung von kondensierten Gerbstoffen; PVP (◆), Gelatine (■), Coffein (○) und Bleiacetat (△).

Die Ergebnisse, die in Abbildung 12 und 13 dargestellt sind, zeigen, dass das Ausmaß der Fällung für Bleiacetat bei basischen pH-Werten zunimmt. Coffein, Gelatine und PVP zeigen eine stärkere Fällung bei sauren pH-Werten. PVP zeigt die größte pH Abhängigkeit.

8.5 Einfluß des Lösungsmittels

8.5.1 Einfluß von Ethanol

Ethanol wird oft als Lösungsvermittler verwendet, um lipophile Extrakten in wäßrigen Puffern zu lösen. Ziel dieses Versuches war es, den Einfluß von Ethanol auf die Fällung von hydrolysierbaren und kondensierten Gerbstoffen zu untersuchen. Abbildung 14 zeigt den Einfluß von Ethanol auf die Fällung von hydrolysierbaren, Abbildung 15 zeigt den Einfluß von Ethanol auf die Fällung von kondensierten Gerbstoffen mit den verschiedenen Fällungsreagenzien.

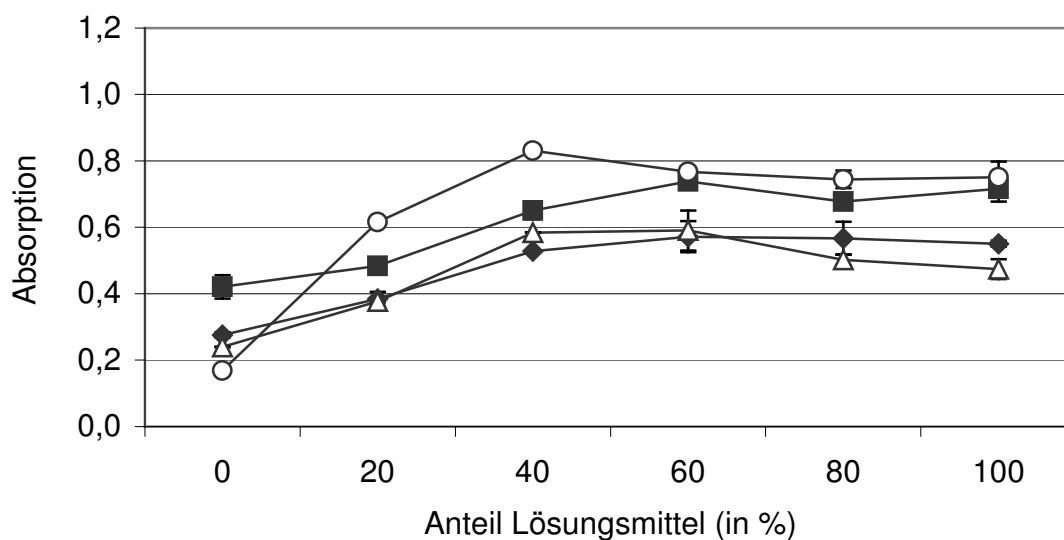


Abbildung 14: Einfluss des Ethanolanteils in der Lösung der hydrolysierbaren Gerbstoffe auf ihre Fällung; PVP (◆), Gelatine (■), Coffein (○) und Bleiacetat (△).

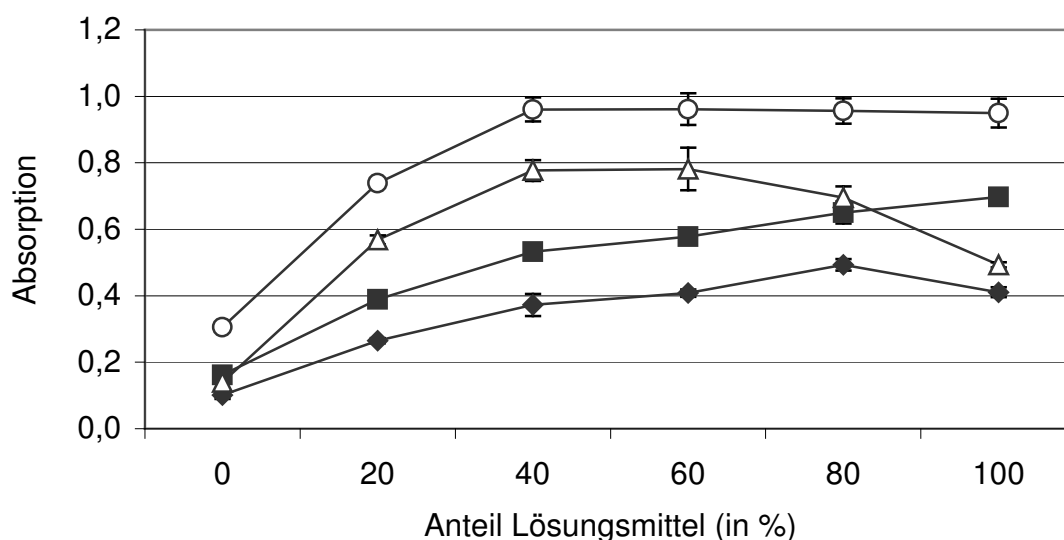


Abbildung 15: Einfluss des Ethanolanteils in der Lösung der kondensierten Gerbstoffe auf ihre Fällung; PVP (\blacklozenge), Gelatine (\blacksquare), Coffein (O) und Bleiacetat (Δ).

Wie die Ergebnisse, die in Abbildung 14 und 15 dargestellt sind, deutlich machen, zeigt Coffein eine starke Abnahme der Wirksamkeit mit zunehmenden Anteil an Ethanol. PVP zeigt die geringste Abnahme der Wirksamkeit mit zunehmendem Anteil an Ethanol.

8.5.2 Einfluß von Methanol

Methanol wird, im Unterschied zu Ethanol und DMSO, im Allgemeinen nicht als Lösungsvermittler für lipophile Extrakte verwendet. Um allerdings allgemeinere Rückschlüsse über den Effekt von Lösungsmitteln auf die Gerbstofffällung zu ziehen, wurde auch der Einfluß von Methanol untersucht. Abbildung 16 zeigt den Effekt von Methanol auf die Fällung von hydrolysierbaren Gerbstoffe durch die verschiedenen Fällungsreagenzien. Abbildung 17 zeigt analog den Einfluß auf die Fällung von kondensierten Gerbstoffen.

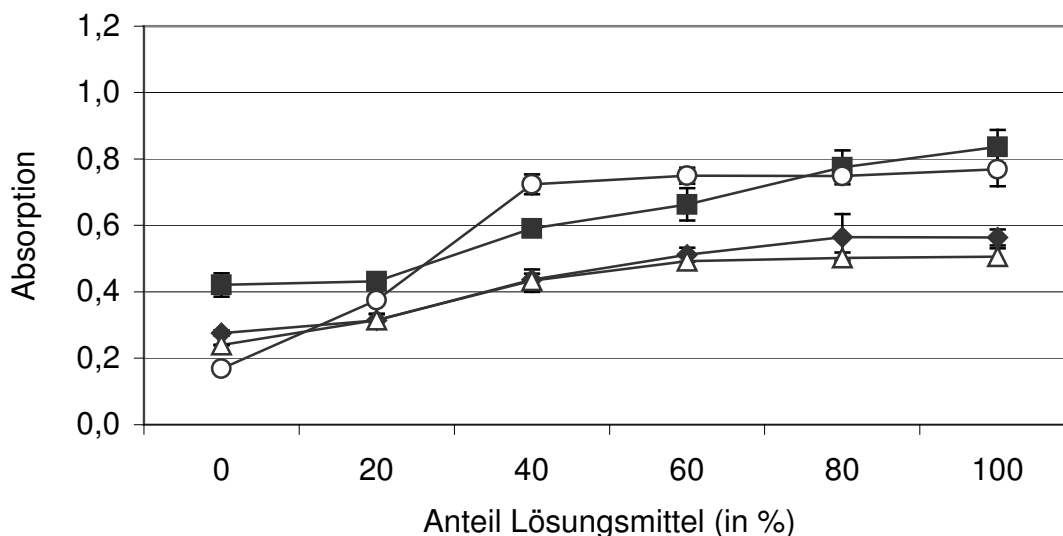


Abbildung 16: Einfluss des Methanolanteils in der Lösung der hydrolysierbaren Gerbstoffe auf ihre Fällung; PVP (◆), Gelatine (■), Coffein (○) und Bleiacetat (△).

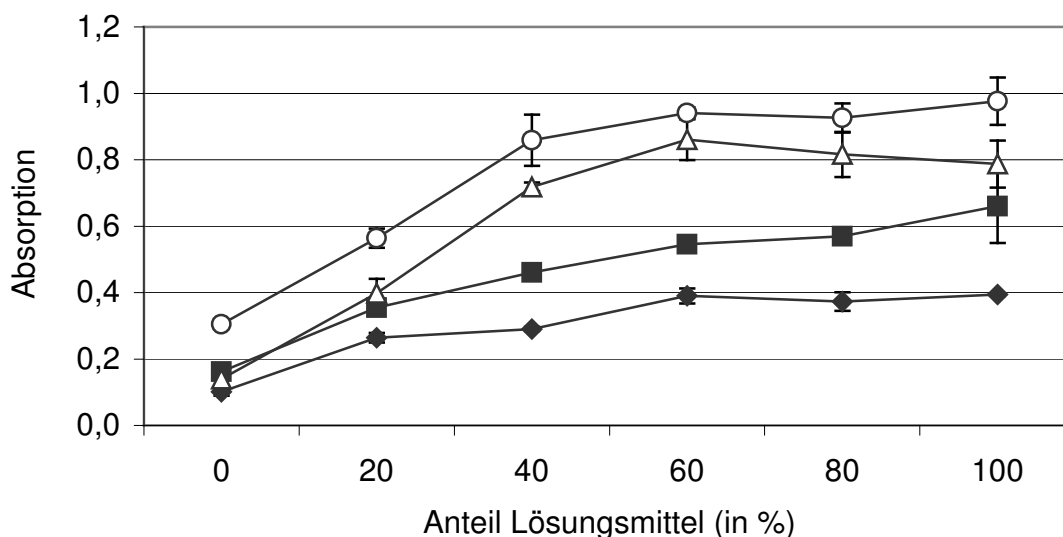


Abbildung 17: Einfluss des Methanolanteils in der Lösung der kondensierten Gerbstoffe auf ihre Fällung; PVP (◆), Gelatine (■), Coffein (○) und Bleiacetat (△).

Die in den Abbildungen 16 und 17 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß Coffein die stärkste Abhängigkeit vom Lösungsmittel besitzt. PVP zeigt eine geringere Abhängigkeit vom Lösungsmittel. Die Ergebnisse für kondensierte und hydrolysierbare Gerbstoffe sind vergleichbar.

8.5.3 Einfluß von Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) wird neben Ethanol oft als Lösungsvermittler für lipophile Extrakte verwendet. Daher sollte auch der Einfluß von DMSO auf die Fällung von

Gerbstoffen untersucht werden. Abbildung 18 zeigt den Einfluß von DMSO auf die Fällung von hydrolysierbaren, Abbildung 19 zeigt den Einfluß von DMSO auf die Fällung von kondensierten Gerbstoffen.

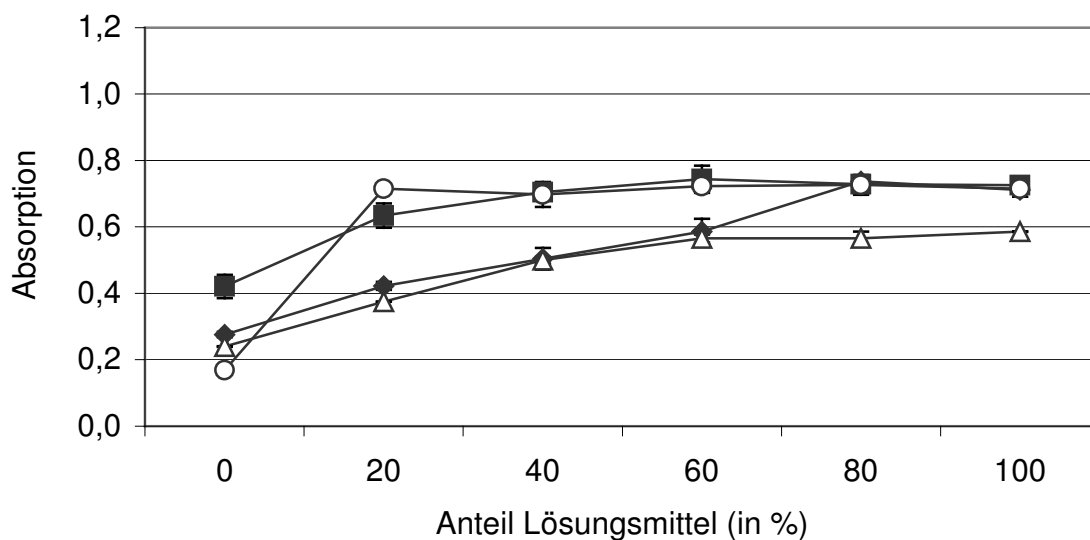


Abbildung 18: Einfluss des Dimethylsulfoxidanteils in der Lösung der hydrolysierbaren Gerbstoffe auf ihre Fällung; PVP (◆), Gelatine (■), Coffein (○) und Bleiacetat (△).

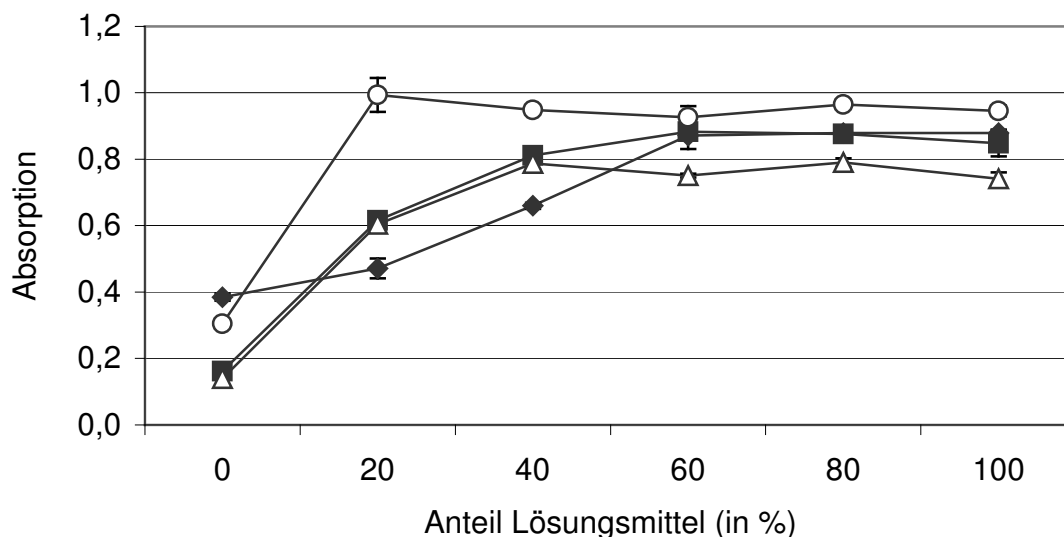


Abbildung 19: Einfluss des Dimethylsulfoxidanteils in der Lösung der kondensierten Gerbstoffe auf ihre Fällung; PVP (◆), Gelatine (■), Coffein (○) und Bleiacetat (△).

Die in Abbildung 18 und 19 dargestellten Ergebnisse machen deutlich, daß Coffein die stärkste Abhängigkeit von der Zugabe des Lösungsmittels zeigt. Bleiacetat wurde durch steigende Anteile von DMSO am wenigsten beeinflusst. Schon bei 20 % Anteil von DMSO zeigte Coffein kaum noch Gerbstofffällungseigenschaften.

8.6 Einfluß der Fällungsreagenzien auf andere Phenole

Ein optimales Gerbstofffällungsreagenz sollte nach Möglichkeit keinen Einfluß auf andere Phenole haben. Daher wurde überprüft, ob und inwieweit die verschiedenen Fällungsreagenzien andere „Nicht-Gerbstoff-Phenole“ fällen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

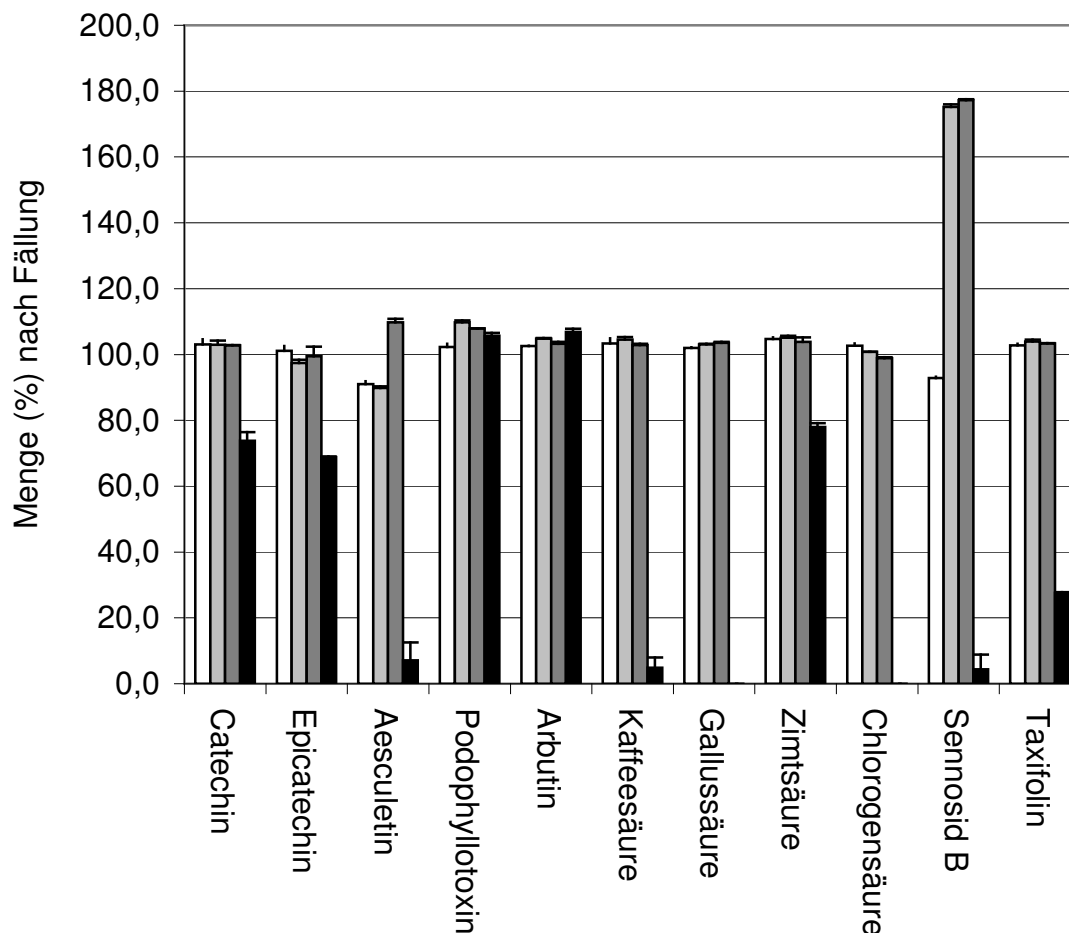


Abbildung 20: Einfluss der Fällungsreagenzien auf die Fällung von „Nicht-Gerbstoff-Phenolen“; von links nach rechts: PVP, Gelatine, Coffein, Bleiacetat

Die in Abbildung 20 gezeigten Ergebnisse machen deutlich, daß Bleiacetat Gerbstoffe nicht spezifisch fällt. Bleiacetat fällte Chlorogensäure und Gallussäure vollständig aus. Bei Aesculetin, Kaffeesäure, Sennosid B und Taxifolin kam es zu einer deutlichen Reduktion. Catechin, Epicatechin und Zimtsäure wurden in geringem Ausmaß mitgefällt. Lediglich Podophyllotoxin und Arbutin wurden nicht mitgefällt.

Die Zunahme der AUC für Sennosid B nach der Zugabe von Gelatine und Coffein ist ungeklärt.

8.7 Einfluß der Assaybedingungen auf die Fällung von Gerbstoffen

Der Aktivitätsassay von Thrombin wird bei pH 8 in einem Trispuffer mit 0,154 mol/l Natriumchlorid durchgeführt. Hier wurde untersucht, welches Fällungsreagenz unter diesen Bedingungen die stärksten Fällungseigenschaften besitzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Effektivität der Fällung unter Thrombintestbedingungen

	kondensierte Gerbstoffe			hydrolysierbare Gerbstoffe		
	Absorption			Absorption		
PVP	0,171	+/-	0,021	1,101	+/-	0,005
Gelatine	0,464	+/-	0,013	1,248	+/-	0,057
Coffein	0,509	+/-	0,015	1,771	+/-	0,062
Bleiacetat	0,121	+/-	0,001	0,742	+/-	0,002

Tabelle 3 zeigt, daß Bleiacetat unter Assaybedingungen die meisten Gerbstoffe fällt, gefolgt von PVP.

8.8 Einfluß der Fällungsreagenzien auf die Aktivität von Thrombin

Ziel dieser Versuchsreihe war es, den Einfluss der Fällungsreagenzien auf die Aktivität von Thrombin zu untersuchen. Da Bleiacetat andere Phenole mit ausfällt, kam es für die weitere Verwendung nicht mehr in Frage und wurde deshalb nicht mit untersucht. Als Vergleich diente die Zugabe von Wasser. Tabelle 4 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 4: Einfluß der Fällungsreagenzes auf die Aktivität von Thrombin

Anteil Reagenz (%)	PVP		Gelatine		Coffein		Wasser	
0	100,0	+/- 7,4	100,0	+/- 6,1	100,0	+/- 1,9	100,0	+/- 9,4
10	94,3	+/- 0,0	103,8	+/- 22,7	91,6	+/- 4,2	99,2	+/- 9,9
25	90,9	+/- 1,2	96,0	+/- 2,8	80,7	+/- 0,0	96,7	+/- 1,6
50	78,9	+/- 15,4	92,2	+/- 1,2	82,8	+/- 1,9	94,7	+/- 2,9

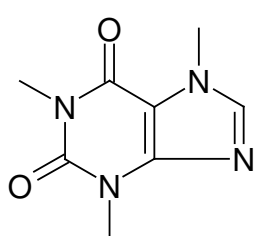
Die in Tabelle 4 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß die Zugabe von Fällungsreagenzien zu einer Abnahme der Aktivität von Thrombin und damit zu einer Abnahme der Empfindlichkeit des Testsystems führt. Bis zu einer Zugabe von 10 % Fällungsreagenz ist der Effekt jedoch gering.

8.9 Diskussion

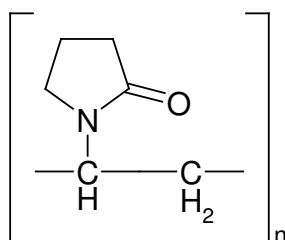
Bei der Betrachtung des Einflusses von Lösungsmitteln, pH und Konzentration des Fällungsreagens fällt auf, daß Gelatine, Coffein und Polyvinylpyrrolidon ein ähnliches Verhalten zeigen.

Alle 3 Fällungsreagenzien führten zu keiner vollständigen Fällung der Gerbstoffe. Dies steht in direktem Zusammenhang mit der Fähigkeit, Gerbstoffe selektiv auszufällen. Andere Phenole wurden nicht mitgefällt. Wahrscheinlich kommt die verbleibende Absorption durch Mono- und Digalloylglucosen, beziehungsweise durch Catechin- und Epicatechinmono- und dimere zustande. Diese beiden Gruppen zeigen eine deutlich geringere Tendenz zur Wechselwirkung mit Proteinen [229,230]. Die Eigenschaften von Polyvinylpyrrolidon sind abhängig von der Oberfläche. Mit zunehmender Oberfläche steigt die Affinität zu einfachen Phenolen [231]. Für diese Versuchsreihen wurde PVP 40 (Mr 40000) verwendet [232].

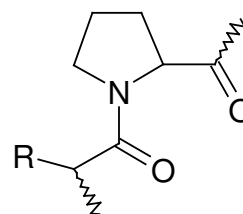
Alle drei Fällungsreagenzien zeigten eine größere Fällungswirkung bei geringerem Lösungsmittelanteil. Dieses Verhalten erklärt sich aus der Art der Wechselwirkung zwischen den Fällungsreagenzien und den Polyphenolen. Gerbstoffe wechselwirken mit Proteinen über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen [68]. Dabei bildet die Aminosäure Prolin die bevorzugte Bindungsstelle [233]. Gelatine enthält 18 % Prolin [234]. Für PVP wird angenommen, dass die Wechselwirkung mit Gerbstoffen primär über Wasserstoffbrücken stattfindet [235]. Allerdings wurden auch hydrophobe Bindungen zwischen Aromaten und Polyvinylpyrrolidon beschrieben [236]. Auch an der Wechselwirkung zwischen Coffein und Polyphenolen sind sowohl hydrophobe Effekte als auch Wasserstoffbrücken beteiligt [237,238]. Die 3 Fällungsreagenzien zeigen strukturelle Ähnlichkeit.



Coffein



Polyvinylpyrrolidon



Peptidyl-Prolyl-Bindungen

Abbildung 21: Strukturen der Fällungsreagenzien

Es zeigte sich, dass die Zugabe von Lösungsmitteln mit H-Brücken Akzeptor Funktion (wie DMF, DMSO), sowie unpolaren Lösungsmitteln (wie Dioxan) zu einer Hemmung der Fällung führt [239,240]. Steigende Anteile Ethanol, welches sowohl H-Brücken Akzeptor als auch Donor Funktionen hat, führen zu einer Schwächung der Wechselwirkung zwischen Phenolen und PVP [241]. Dies gilt analog für Methanol. Die Zugabe von 25 % Methanol führt zu einer ca. 30 %igen geringeren Fällung von Phenolen durch PVP [242]. Es wird angenommen, dass hydrophobe Wechselwirkungen vor allem in hydrophilen Lösungsmitteln und Wasserstoffbrückenbindungen vor allem in hydrophoben Lösungsmitteln auftreten [243]. Das Verhalten der drei Fällungsreagenzien zeigt einen zunehmenden Verlust der hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken mit zunehmenden Anteil des Lösungsmittels. Dieser Effekt setzt um so früher ein, je stärker die Wasserstoffbrückenakzeptorfunktion des jeweiligen Lösungsmittels ist.

Alle drei Fällungsreagenzien zeigten eine stärkere Fällung bei sauren pH Werten. Dabei traten keine Unterschiede zwischen kondensierten und hydrolysierbaren Gerbstoffen auf. Bei niedrigem pH liegen die Hydroxylgruppen der Gerbstoffe nicht ionisiert vor, so daß Wasserstoffbrücken möglich sind [240]. PVP bindet bei niedrigen pH Werten besser an Gerbstoffe [242]. Bei pH 8,2 trat keine Fällung zwischen Gerbstoffen und Gelatine und PVP auf [244]. Auffällig ist, dass die Effektivität der Fällungsreagenzien unter Thrombintestbedingungen (pH 8) verschoben ist. Dies erklärt sich mit anderen Bedingungen, wie dem pH und der Ionenstärke, welche einen Effekt auf die Fällung von Gerbstoffen haben [245].

Bleiacetat zeigte ein im Vergleich zu PVP, Gelatine und Coffein unterschiedliches Verhalten. Es zeigte stärkere Gerbstofffällungseigenschaften bei alkalischen pH Werten. Auffällig war, daß die Fällungswirkung bei einem hohen Lösungsmittelanteil teilweise wieder zunahm. Bleiacetat zeigte keine Selektivität zwischen einfachen Phenolen und Gerbstoffen. Metallionen reagieren mit Gerbstoffen unter Komplexbildung. Dabei werden Protonen frei. Der entstehende Chelatkomplex ist ungeladen, da es sonst zu keiner Fällung kommt [246]. Lösungsmittel beeinflussen die Stöchiometrie der Komplexe zwischen Metallion und Phenol [247]. Sie beeinflussen die Löslichkeit des Komplexes und sie dienen als Ligand in Komplexen [248,249]. Einen günstigen Einfluss auf die Stabilität von Komplexen haben Wasserstoffbrücken, die Lösungsmittel, wie Methanol, mit den gebundenen Liganden eingehen [250]. Welcher

Einfluss zu einer Zunahme der Fällungswirkung bei höheren Lösungsmittelanteilen von Methanol und Ethanol führte, wurde nicht geklärt.

9 Selektivität der Wechselwirkung kondensierter Gerbstoffe mit Proteinen

9.1 Einleitung

Die allgemeine Meinung, daß Gerbstoffe unspezifisch Enzyme hemmen, steht im Widerspruch zu einer Reihe von Ergebnissen. So zeigten die kondensierten Gerbstoffe aus Rhizoma Rhei keinen Einfluss auf verschiedene Enzyme des Harnstoffzyklus, während sie das Enzym Glutamat Synthetase aktivieren [251]. Die kondensierten Gerbstoffen aus 18 verschiedenen Pflanzenquellen zeigten unterschiedliche IC₅₀ Werte bei der Inhibition von verschiedenen Proteinkinasen [252]. Gerbstoffe aus unterschiedlichen Pflanzenquellen hemmten das Angiotensin-Converting Enzym unverändert auch nach der Zugabe eines Überschusses von Rinderserumalbumin [216]. Den Gerbstoffen aus verschiedenen Pflanzenquellen werden zum Teil ganz unterschiedliche Wirkungen zugeschrieben. So zeigten die Proanthocyanidine aus Crataegus in verschiedenen Modellen eine Erhöhung der Koronardurchblutung, eine Kontraktilitätssteigerung des Herzens und eine blutdrucksenkende Wirkung [253,254]. Dem in Japan und China häufig konsumierten gerbstoffreichen grünen Tee werden unter anderem anti-arteriosklerotische, -mutagene und -karzinogene Wirkungen zugewiesen [255]. Die kardiovaskulär protektiven Wirkungen der Gerbstoffe aus Kakao und Rotwein wurden bereits in Kapitel 4.2 besprochen.

Die Ergebnisse zeigen, dass es offenbar eine gewisse Selektivität der Interaktion zwischen Gerbstoffen und Proteinen gibt. Das Problem ist allerdings, daß der Bereich der biologisch aktiven höher kondensierten Gerbstoffe analytisch nicht zugänglich ist (siehe Kapitel 4.3). Beispielsweise besteht die durchschnittliche Kettenlänge der biologisch aktiven, mit Speichelprotein wechselwirkenden, kondensierten Gerbstoffe aus Weintraubensamen aus durchschnittlich 7 Untereinheiten [256].

Verschiedene gerbstoffreiche Drogen zeigten eine deutliche Thrombinhemmung (siehe 7.4). Von diesen Drogen wurde Zimtrinde zufällig für die weitere Bearbeitung ausgesucht.

Ziel dieser Versuchsreihe war es, zu untersuchen, ob innerhalb des untrennbaren Isomerengemisches der höheren kondensierten Gerbstoffe verschiedene Proanthocyanidine mit verschiedenen Proteinen interagieren.

Dazu wurden die Proteine mit den aus Zimt isolierten Gerbstoffen im jeweiligen Fällungsmaximum gefällt, durch Zentrifugation abgetrennt und die Zusammensetzung durch säurekatalysierten Abbau bestimmt.

Da der pH Wert für die Interaktion von Gerbstoffen mit Proteinen von großem Einfluß ist, wurden vorher die pH Bedingungen bestimmt, bei der die Interaktion zwischen Gerbstoff und jeweiligen Protein maximal ist [257].

9.2 Gewinnung von biologisch aktiven kondensierten Gerbstoffen aus Zimtrinde

Der Gehalt an Gerbstoffen in Cortex Cinnamomi liegt bei 2%. Am Aufbau der kondensierten Gerbstoffe sind die monomeren Bausteine (-)-Epicatechin und (+)-Catechin beteiligt. Charakteristisch ist das Vorkommen von Procyanidin A2 [193]. Bei dem längsten bisher isolierten kondensierten Gerbstoff aus Cinnamomum Ceylanicum handelt es sich um ein Pentamer [258].

Gepulverte Zimtrinde wurde in Hexan suspendiert und mit einem Ultraturax zerkleinert. Damit wurde eine Edestahlkartusche der Größe 400 x 100 mm befüllt. Anschließend wurde erschöpfend in der Reihenfolge mit den Lösungsmitteln Hexan, Dichlormethan und Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden zur Trockne eingeengt.

Der Methanolextrakt wurde in Methanol/Wasser (8:2) gelöst und auf einer Glassäule (450 x 15 mm), gefüllt mit Sephadex LH 20 Material, nach der Methode von Gu getrennt [259].

Abbildung 22 zeigt die Hemmung von Thrombin durch die verschiedenen Fraktionen der Zimtrinde. Das Eluat des Fließmittels Methanol wurde in 4 Unterfraktionen gesammelt. Methanol 1 ist das zwischen 0 und 100 ml, Methanol 4 ist das zwischen 300 und 400 ml gesammelte Eluat. Die experimentellen Details sind unter 5.1 im experimentellen Teil beschrieben.

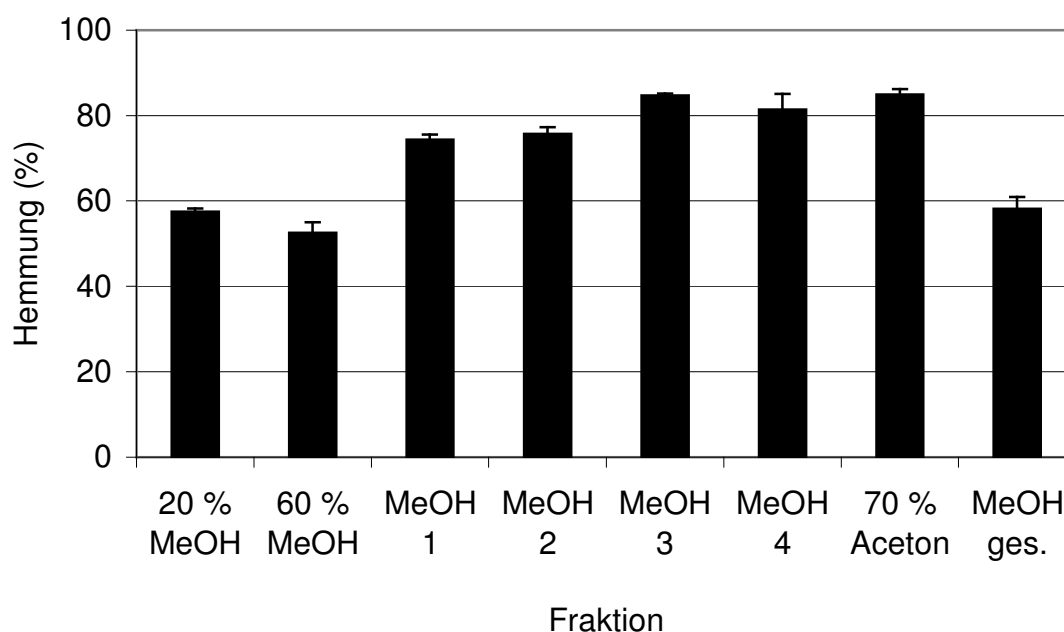


Abbildung 22: Hemmung von Thrombin durch die unterschiedlichen Fraktionen (Konzentration 0,3 mg/ml), die aus Zimtrinde durch Fraktionierung auf einer Sephadex LH 20 Säule gewonnen wurden.

Die in Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die kondensierten Gerbstoffe mit der höchsten Aktivität gegenüber Thrombin sich in dem Eluat aus Aceton/Wasser (7:3) befanden. Diese Fraktion besteht aus polymeren Gerbstoffen mit einer Kettenlänge von mehr als 10 Untereinheiten [259]. Diese Fraktion wurde zur Trockne eingengt und für die weiteren Versuche verwendet.

9.3 Bestimmung der Fällungsmaxima für die verwendeten Proteine

Um die Zusammensetzung der Gerbstoffe zu bestimmen, welche die unterschiedlichen Proteine ausfällen, sollte jedes Protein in seinem Fällungsmaximum gefällt werden. Dies ist abhängig von den Eigenschaften des Gerbstoffes, des Proteins sowie der Bedingungen [260]. Zur Bestimmung des Fällungsmaximums wurde die Methode von Hagerman verwendet [228].

Um das Fällungsmaximum zu bestimmen, wurde jedes Enzym mit kondensierten Gerbstoffen bei pH Werten im Bereich von 2-12 gefällt. Der Rückstand wurde abzentrifugiert, aufgeschüttelt und mit Eisen-(III)-chloridlösung versetzt. Anschließend wurde die Absorption bei 510 nm bestimmt. Je höher die anschließende Absorption war, desto mehr Gerbstoffe sind ausgefallen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

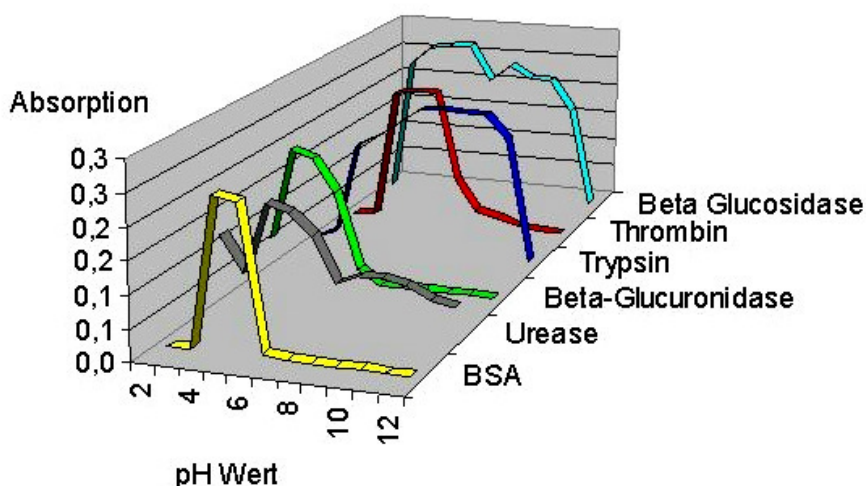


Abbildung 23: Bestimmung der Fällungsmaxima der einzelnen Proteine

Abbildung 23 zeigt folgende Fällungsmaxima (siehe Tabelle 5):

Tabelle 5: Fällungsmaxima der Proteine

Rinderserumalbumin	pH 5	Trypsin	pH 8 - 10
Urease	pH 4 - 5	Thrombin	pH 6
Beta-Glucuronidase	pH 3 - 4	Beta-Glucosidase	pH 5 - 6

Die Fällungsmaxima für Trypsin und Rinderserumalbumin wurden bereits in der Literatur für Gerbstoffe aus Raps und Tanninsäure beschrieben [227,230]. Es zeigte sich, dass die dort bestimmten Maxima um einen pH Wert niedriger lagen, die Kurvenverläufe aber identisch waren. Für beta-Glucosidase wurde eine vollständige Fällung im Bereich pH 2 – 7,5 beschrieben, wobei allerdings unklar ist, in welchem pH Bereich getestet wurde [95].

9.4 Säurekatalysierter Abbau kondensierter Gerbstoffe in Gegenwart von Phloroglucinol

Erhitzt man kondensierte Gerbstoffe in heißen Alkoholen in der Gegenwart nucleophiler Reagenzien wie Phloroglucinol oder Benzylmercaptan, kommt es zu einem Abbau in Untereinheiten. Dabei bleibt das Endstück der Kette unterivatisiert, während sich aus den anderen Einheiten die Phloroglucinolderivate bilden. Durch Analyse der Untereinheiten kann man Aussagen über die Zusammensetzung der Gerbstoffe treffen. Verwendet für den Abbau der kondensierten Gerbstoffe wurde die Methode nach Kennedy, welche den Abbau mit Phloroglucinol in Gegenwart von Ascorbinsäure

durchführt [109]. Der hypothetische Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 24 dargestellt.

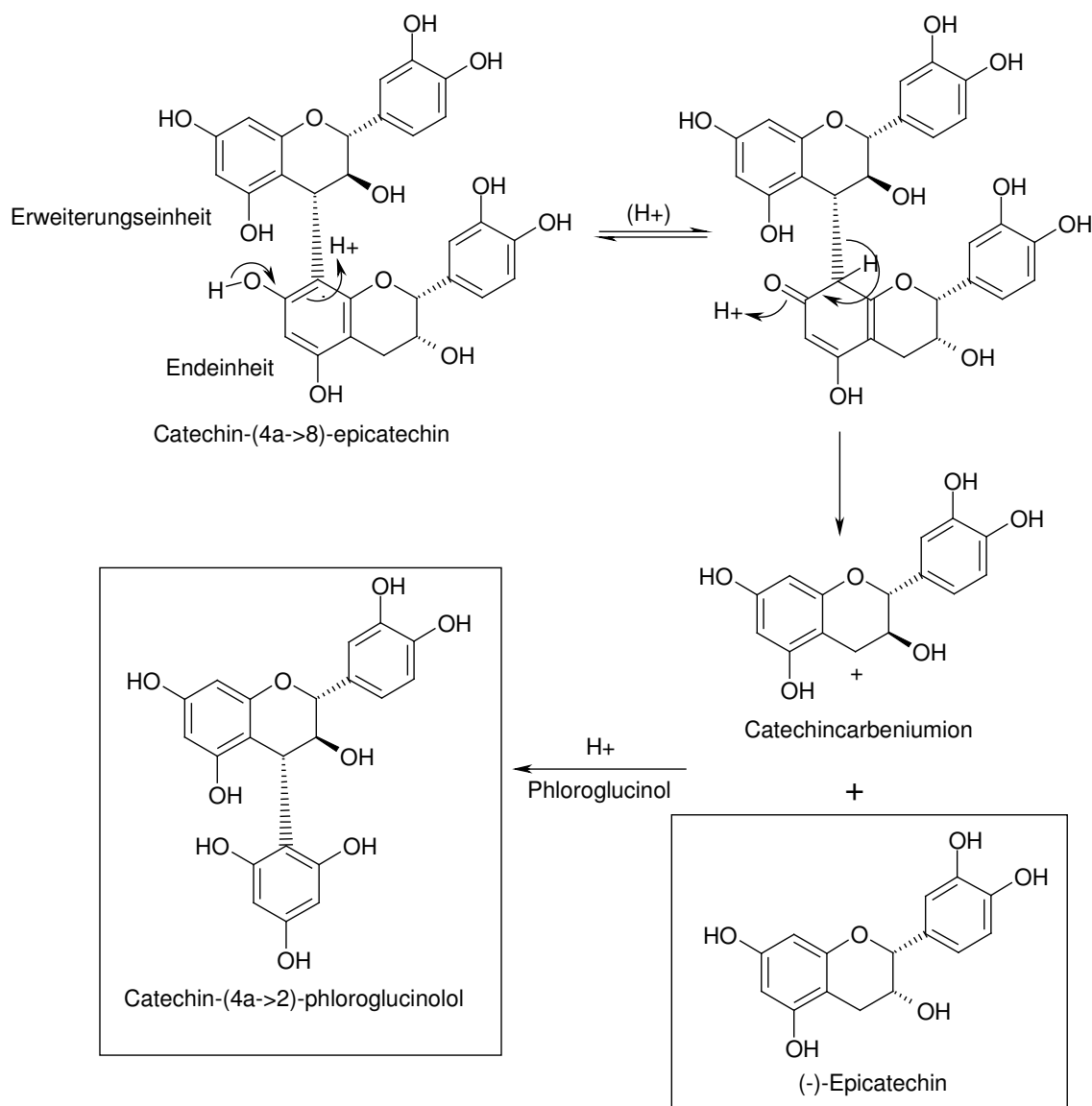


Abbildung 24: Hypothetischer Reaktionsmechanismus des säurekatalysierten Abbaus der kondensierten Gerbstoffe (modifiziert nach [108,109,261])

Der Abbau von kondensierten Gerbstoffen äußert sich chromatographisch dann folgendermaßen (Abb. 25: kondensierte Gerbstoffe vor dem Abbau; Abb. 26: kondensierte Gerbstoffe nach dem Abbau):

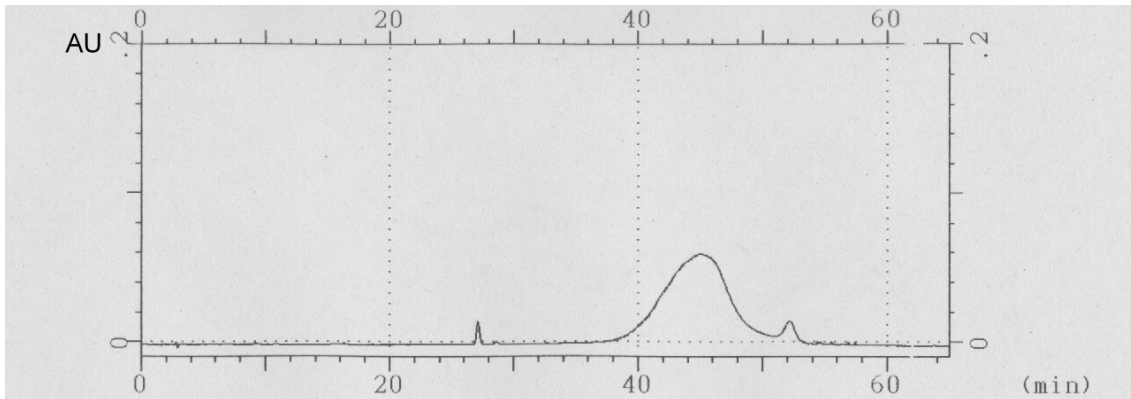


Abbildung 25: Chromatogramm von kondensierten Gerbstoffen, die aus Zimtrinde gewonnen wurden

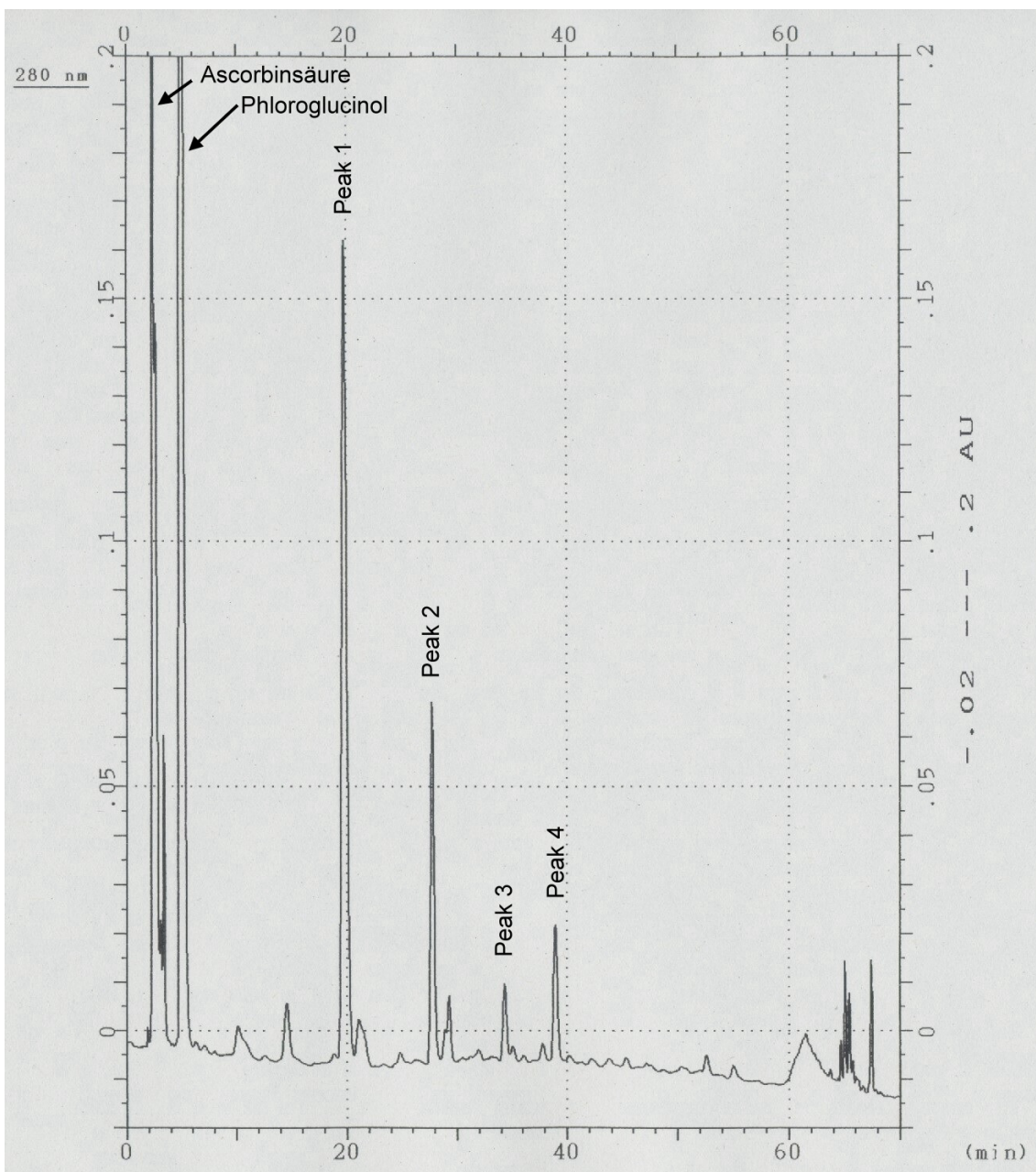


Abbildung 26: Abbauprodukte der kondensierten Gerbstoffe.

Die Abbildungen (Abb. 25, Abb.26) zeigen, daß die kondensierten Gerbstoffe zu den Monomeren abgebaut wurden. Die Retentionsreihenfolge der zu erwartenden Abbauprodukte unter den gegebenen Bedingungen ist: Catechin(4 α ->2)Phloroglucinol, Epicatechin(4 β ->2)Phloroglucinol, (+)-Catechin, (-)-Epicatechin [109]. In dem abgebildeten Chromatogramm könnte Peak 1 eines der beiden Phloroglucinolderivate darstellen, Peak 2 Catechin und Peak 4 Epicatechin. Peak 3 könnte ein Diphlroroglucinolartefakt darstellen [109]. Eine Strukturaufklärung der Substanzen gelang nicht.

9.5 Zusammensetzung der biologisch aktiven Gerbstoffe nach der Fällung mit den unterschiedlichen Proteinen

Das Ausmaß der Fällung der Gerbstoffe hängt von der Primär- und Tertiärstruktur der Proteine ab. Um eine Aussage über die Zusammensetzung der Abbauprodukte zu treffen, wurden die relativen Werte errechnet. Die Standardabweichung nimmt mit dem Gesamtausmaß der Fällung ab.

Abbildung 27 zeigt die addierten AUCs der Peaks 1-4. Es zeigt sich, daß das Enzym beta-Glucosidase in größerem Maße mit den Gerbstoffen reagiert als Thrombin. Dadurch sind die absoluten Werte nicht mehr vergleichbar. Um die Verhältnisse der monomeren Abbauprodukte zueinander zu bestimmen, wurden die relativen Werte berechnet (Tab. 6). In Abbildung 28 werden diese Werte grafisch dargestellt.

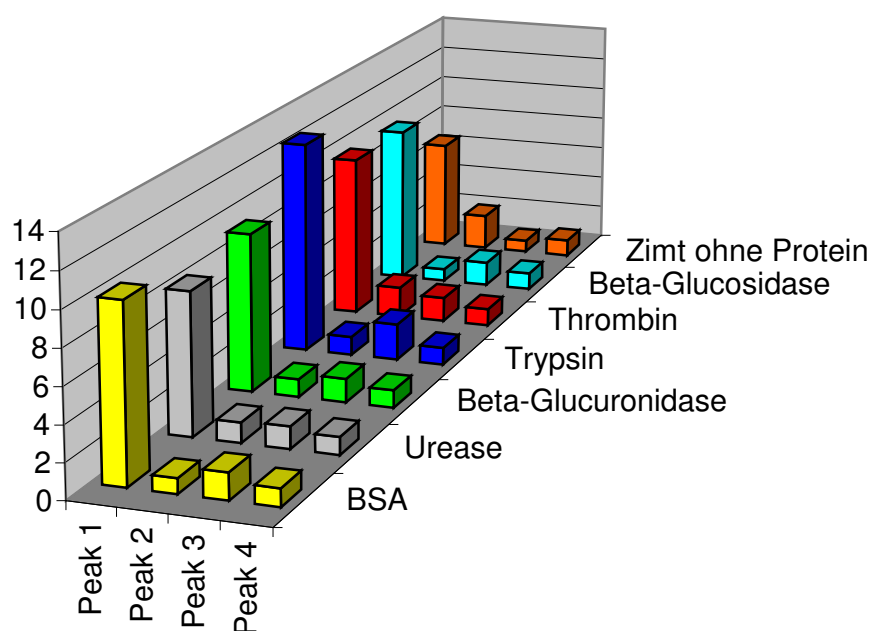


Abbildung 28: grafische Darstellung der Verhältnisse der Abbauprodukte zueinander.

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede zwischen den einzelnen Reihen signifikant sind, wurde eine einfache Varianzanalyse durchgeführt. Die Voraussetzung dazu, Prüfung auf Varianzenhomogenität, wurde mit dem Cochran Test bestimmt [262]. Dies wurde für den Vergleich der mit den Proteinen gefällten Gerbstoffen durchgeführt, sowie für den Vergleich sämtlicher Werte einer Reihe. Die Varianzenhomogenität war nicht gegeben bei dem Vergleich der Meßwerte inklusive „Zimt ohne Protein“ (= Gerbstoff aus Zimtrinde). Somit konnte hier keine Varianzanalyse durchgeführt werden. Der Vergleich der Meßwerte der mit Protein gefällten Gerbstoffe ergab einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %.

9.6 Diskussion

Vergleicht man die Zusammensetzung der Abbaumuster der einzelnen Gerbstoffe, die mit den Proteinen gefällt wurden, stellt man signifikante Unterschiede fest. Damit zeigt sich, dass innerhalb der Gruppe der oligomeren bis polymeren Gerbstoffe bestimmte Gerbstoffe bevorzugt an bestimmte Proteine binden. Die Gerbstoffe unterscheiden sich in ihrer Kettenlänge und ihrer Zusammensetzung. Allerdings war der Unterschied innerhalb der Gerbstoffe, die mit den Proteinen gefällt wurden, geringer als der Unterschied zwischen den Gerbstoffen, die mit den Proteinen reagierten, und den Gerbstoffen, die direkt abgebaut wurden.

Da keine ausreichende Strukturaufklärung der Abbauprodukte gelang, kann keine detaillierte Aussage über die Zusammensetzung der Untereinheiten getroffen werden. Peak 1 ist wahrscheinlich ein Phloroglucinolderivat, welches nur durch nicht endständige Monomere gebildet wird. Dadurch wird deutlich, dass die durchschnittliche Kettenlänge der Gerbstoffe, die mit den Proteinen reagieren, länger ist, als die durchschnittliche Kettenlänge der nicht mit Proteinen gefällten Gerbstoffe.

Es ist bekannt, daß die Fähigkeit von kondensierten Gerbstoffen, an Proteine zu binden, mit ihrer Größe zunimmt [263]. Mindestens 3 Flavonoid-Untereinheiten sind notwendig, um Proteine zu fällen [264].

Die Selektivität der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und kondensierten Gerbstoffen wird durch mehrere Faktoren bestimmt. Die Reaktivität von Polyphenolen gegenüber Proteinen steigt mit ihrer Größe und konformativen Flexibilität und nimmt mit ihrer Wasserlöslichkeit ab [265]. Prolinreiche Proteine mit konformativer Flexibilität zeigen höhere Affinitäten zu Gerbstoffen, als prolinarme Proteine mit kompakter Struktur [266]. Allerdings wird auch ein Einfluß anderer Aminosäuren, wie Arginin und Phenylalanin, diskutiert [267]. Innerhalb der kondensierten Gerbstoffe zeigte sich, dass (+)-Catechin und eine C(4)-C(8)-Verbindung zu einer höheren Affinität für prolinreiche Proteine führt, als (-)-Epicatechin und eine C(4)-C(6)-Verbindung [268]. Eine Prolin-Prolin Sequenz stellt eine bevorzugte Bindungsstelle da [233].

Hagerman zog daher den Schluß, dass es möglich wäre, ein Protein durch Gerbstoffe, auch in Gegenwart eines anderen Proteins, zu fällen [234].

Die Ergebnisse zeigen, daß unterschiedliche Proanthocyanidine mit den verschiedenen Proteinen wechselwirken. Eine pflanzencharakteristische Gerbstoffzusammensetzung wäre dann die Grundlage für eine selektive Interaktion mit bestimmten Proteinen. Aufgrund dieser Ergebnisse wäre es theoretisch also denkbar, daß bestimmte Gerbstoffe mit Trypsin im Gastrointestinaltrakt reagieren, andere resorbierte Gerbstoffe mit Serumalbumin reagieren und wieder andere Gerbstoffe mit Thrombin reagieren und so positive Effekte bei thrombotischen Erkrankungen haben. Das Beispiel der in vivo Hemmung des Angiotensin Konversionenzym durch Procyanidine unterlegt diese Theorie [269].

10 Fettsäuren in Herba Adonidis, Flores Sambuci, Semen Erucae und ihre Hemmung von Thrombin

10.1 Einleitung

Die übliche Vorgehensweise zur Isolierung einer aktiven Verbindung besteht darin, den Polaritätsbereich der Inhaltstoffe immer weiter einzugrenzen, bis im letzten Schritt die einzelnen Substanzen isoliert werden. In unserem Arbeitskreis besteht die Standardprozedur in der Erstellung von selektiven Extrakten, welches ein kontinuierliches Extraktionsverfahren ähnlich der Perkolation darstellt mit der Ergänzung, dass die Droge vor der Extraktion mit einem Ultraturax bis auf zelluläre Bestandteile zerkleinert wird. Der nächste Schritt besteht in der Anwendung einer präparativen Extrographie, einer modifizierten Normalphasenchromatographie. Der gewöhnlich letzte Schritt zur Isolierung der Reinsubstanz besteht in der Trennung auf reversed phase Säulen [270,271].

Aus den wirksamsten Drogen des Screenings wurde Herba Adonidis für die weitere Bearbeitung ausgewählt. Die Erstellung von selektiven Extrakten führte zu dem Ergebniss, dass der Hexanextrakt am wirksamsten war. Der Vergleich der Wirksamkeit des Hexanextraktes, der durch selektive Extraktion gewonnen wurde, mit einem Hexanextrakt, der durch eine einfache 2 stündige Bewegungsmazeration gewonnen wurde, brachte das Ergebniss, dass der durch Bewegungsmazeration gewonnene Extrakt wirksamer war.

Mit diesem Extrakt wurde anschließend eine analytische Extrographie durchgeführt. Die wirksamste Unterfraktion war die Unterfraktion 4. Ein ^{13}C -NMR dieser Unterfraktion zeigte die typischen Signale von freien Fettsäuren. Freie Fettsäuren waren demnach der Grund für die Inhibition von Thrombin.

Abbildung 29 zeigt die Hemmung Thrombins durch die hergestellten Extrakte. Es wird deutlich, daß der durch Bewegungsmazeration hergestellte Hexanextrakt die höchste inhibitorische Aktivität besitzt..

Abbildung 30 zeigt die Trennung dieses Hexanextraktes durch analytische Extrographie (siehe experimenteller Teil 6.1). Die Wirksamkeiten der Unterfraktionen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

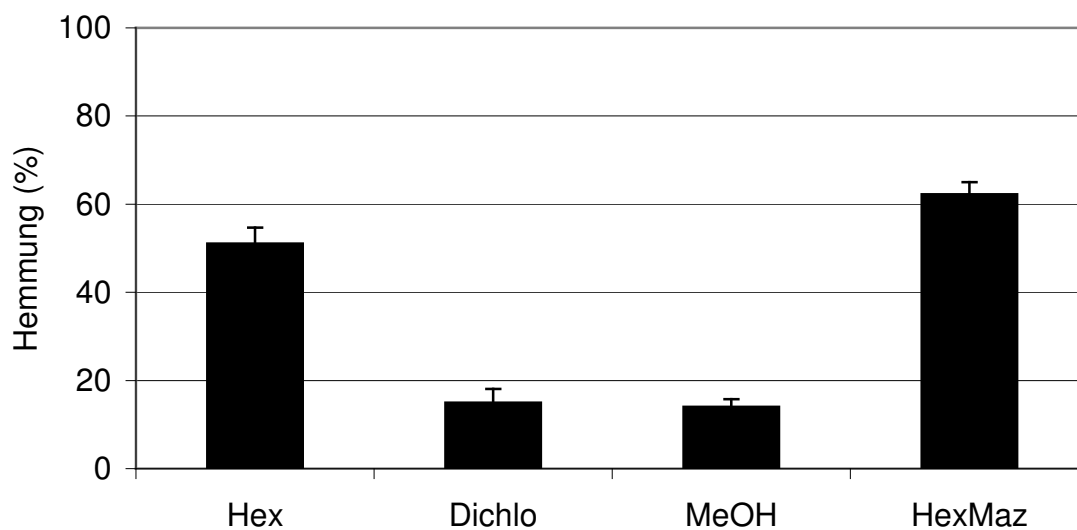


Abbildung 29: Hemmung von Thrombin durch die hergestellten Extrakte in der Konzentration 0,5 mg/ml; Hex = Hexan; Dichlo = Dichlormethan; MeOH = Methanol; HexMaz = Hexan Mazeration

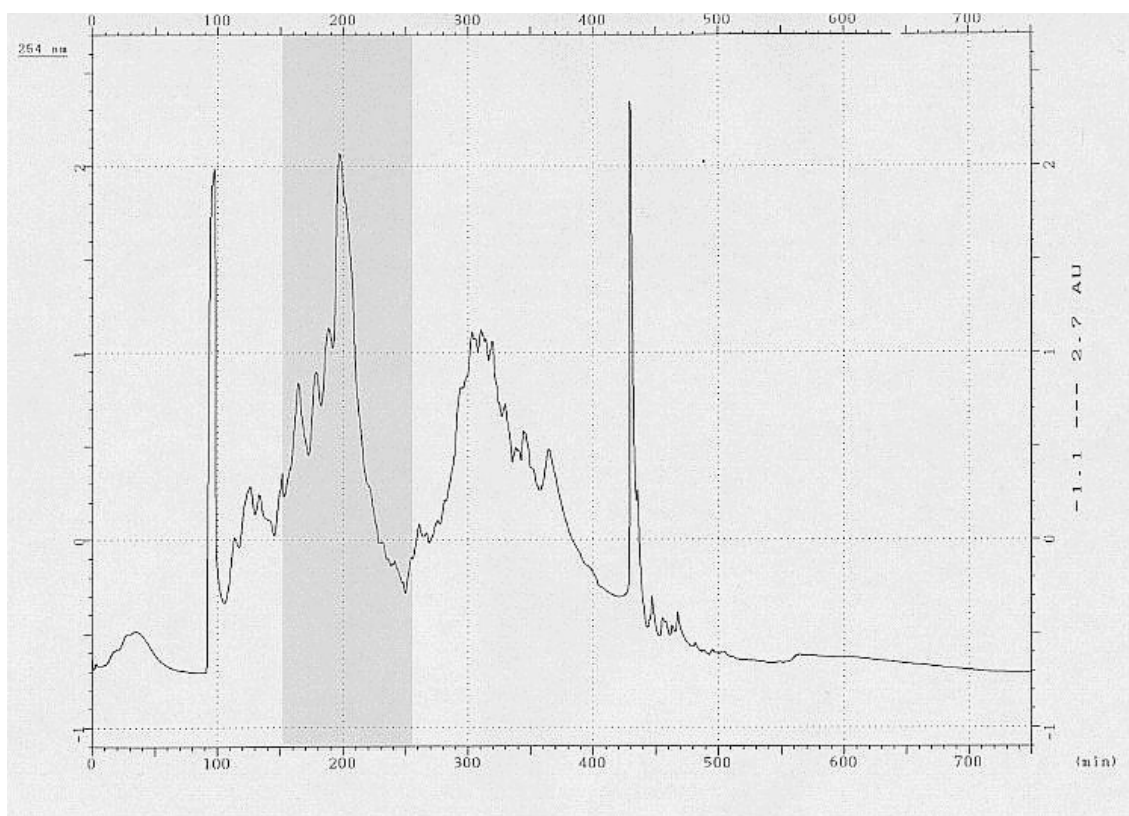


Abbildung 30: Analytische Extrographie des Adonis Hexan (Mazerat) Extraktes. Unterfraktion 4 (Min. 150 – 255) zeigte die größte Wirksamkeit.

Tabelle 7: Hemmung von Thrombin durch die einzelnen Unterfraktionen (Konzentration 0,5 mg/ml)

Unterfraktion	Minute	Hemmung (%)		
1	0 - 90	30,8	+/-	0,7
2	90 - 105	4,1	+/-	1,4
3	105 - 150	7,5	+/-	0,7
4	150 - 255	85,0	+/-	0,7
5	255 - 345	55,0	+/-	0,7
6	345 - 420	45,8	+/-	4,1
7	420 - 750	29,3	+/-	0,0

Tabelle 7 zeigt, daß die Unterfraktion 4 am wirksamsten ist.

Die direkte Isolierung von freien Fettsäuren auf reversed phase Säulen ist schwierig. Freie Fettsäuren sind mit zunehmender Anzahl der vorhandenen Doppelbindungen besser löslich und besser per UV-Detektor detektierbar [177]. Gesättigte Fettsäuren sind demnach schwierig zu detektieren. Da ein ELSD Detektor zu einer Zerstörung der Probe führt und eine UV-Detektion bei niedrigen Wellenlängen die Auswahl der geeigneten Lösungsmittel sehr begrenzt, wurde die Strategie zur Bestimmung der Fettsäuren geändert.

In einem ersten Schritt wurden die Gesamtlipide der Drogen extrahiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Abtrennung der freien Fettsäuren von anderen Lipidklassen durch präparative Dünnschichtchromatographie. Die Identifizierung erfolgte schließlich durch Massenspektrometrie. Zur Bestimmung der Wirksamkeit wurden die Fettsäuren eingekauft und getestet. Dabei sollte überprüft werden, ob eine Kombination der Fettsäuren einen synergistischen Effekt auf die Wirksamkeit besitzen.

Die Chromatogramme der Hexanextrakte von Flores Sambuci und Semen Erucae zeigten Substanzen mit ähnlichen Retentionszeiten und UV-Spektren, so das auch bei diesen Drogen freie Fettsäuren als wirksame Komponente vermutet wurden. Diese Drogen wurden deshalb dem gleichen Prozedere unterworfen, um auch hier die Fettsäuren zu identifizieren und ihre Wirksamkeit zu bestimmen.

10.2 Extraktion und präparative DC

Die Extraktion der Lipide aus der Pflanzenmatrix erfolgte mit Hexan/Isopropanol 3:2 [272]. Da es nicht möglich ist, mit nur einem Lösungsmittel sowohl polare als auch apolare Lipide zu extrahieren, ist es notwendig, eine Kombination von Lösungsmitteln zu verwenden.

Zur Abtrennung der Fettsäuren von den anderen Lipidklassen wurde die Methode der präparativen Dünnschichtchromatographie verwendet. Dazu wurden DC Platten ohne Fluoreszenzindikator verwendet. Die Detektion der Banden erfolgte durch Besprühen mit Primulinreagenz und anschließender Detektion unter der UV Lampe bei 366 nm. Der Anteil der Fettsäurebande an der Gesamtmenge, die getrennt wurde, betrug bei Adonis 25 %, bei Eruca 54 %, bei Sambuci 36 % und entspricht dem ungefähren Anteil der freien Fettsäuren an den Gesamtlipiden.

Die Fettsäurefraktion, die durch präparative Dünnschichtchromatographie gewonnen wurde, wurde für alle weiteren Experimente verwendet.

10.3 Identifizierung der Fettsäuren

Die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte durch Herstellung der Fettsäuremethylester und anschließende LC/MS mit Elektronen-Stoß-Ionisation.

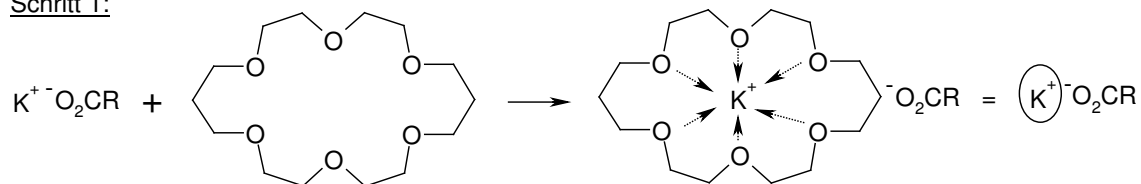
Die Herstellung von Fettsäuremethylestern (FAME) erfolgte durch Erhitzen der Fettsäure mit Methanol in Gegenwart von Bortrifluorid [273]. Durch anschließende LC/MS Messung der FAME und Vergleich der Fragmentierungsmuster mit Referenzspektren wurden Linol-, Linolen- und Palmitinsäure als Fettsäuren in Adonis und Sambuci und Linol-, Linolen-, Öl-, Eicososen- und Erucasäure als Fettsäuren in Samen Erucae gefunden.

10.4 Verteilung der Fettsäuren

Fettsäuren haben einen niedrigen Extinktionskoeffizienten. Somit ist die mengenmäßige Analyse der Fettsäuren bei niedrigen Wellenlängen ungenau. Die Einführung eines Chromophores löst dieses Problem. Da dadurch alle Fettsäuren das gleiche Chromophor besitzen, ist es möglich, direkt über die Peakfläche die genaue Zusammensetzung der Fettsäuren zu bestimmen.

Verwendet wurde die Derivatisierung zu Phenacylestern mit p-Bromphenacylbromid als Edukt und 8-Kronenether als Katalysator. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 31 dargestellt.

Schritt 1:



Schritt 2:

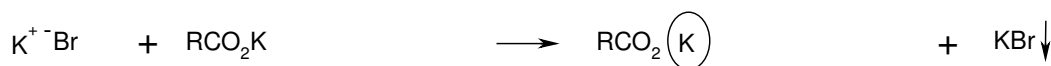
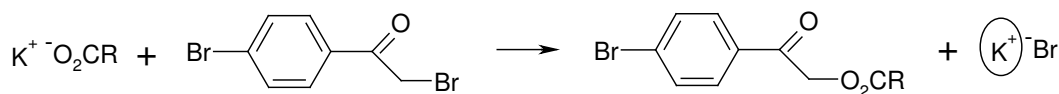


Abbildung 31 (modifiziert nach Durst [274]): Reaktionsmechanismus der Derivatisierung der Fettsäuren mit p-Bromphenacylbromid unter Kronenetherkatalyse

Da der Thrombinassay unter wäßrigen Bedingungen (mit 5 % Ethanol) durchgeführt wurde, stellte sich die Frage, ob die Zusammensetzung der Fettsäuren in der Droge der Zusammensetzung der Fettsäuren, die sich unter Assaybedingung lösen, entspricht. Dazu wurde die Fettsäurefraktion unter Assaybedingungen gelöst, der unlösliche Anteil abzentrifugiert und die Fettsäuren aus dem Assaypuffer reextrahiert. Diese Fettsäuren wurden auch derivatisiert und ihre Zusammensetzung bestimmt.

Tabelle 8 zeigt die Zusammensetzung der Fettsäuregemische in den jeweiligen Extrakten an (linke Spalte) sowie die Zusammensetzung der Fettsäuregemische, nachdem sie im Thrombinpuffer gelöst wurden und der ungelöste Anteil abzentrifugiert wurde (rechte Spalte). Bei dem Vergleich der Fettsäurezusammensetzung zeigte sich keine deutliche Differenz. Für einzelne Fettsäuren wurde auch keine Tendenz beobachtet. So nimmt die gelöste Menge an Palmitinsäure im wäßrigen Extrakt der Fettsäuren von Flores Sambuci ab, während im Vergleich dazu die gelöste Menge an Palmitinsäure im wäßrigen Extrakt der Fettsäuren von Herba Adonidis zunimmt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Fettsäuren im Drogenextrakt sowie unter Assaybedingungen – keine Unterschiede; die +/- Werte geben die einfache Standardabweichung an

	Fettsäure	Retentionszeit (Min)	Zusammensetzung im Extrakt (in %)		Zusammensetzung nach der Reextraktion (%)*	Differenz (%)	
Adonis	Linolensäure	18,67	28,2	+/- 0,3	26,8	+/- 0,5	-1,4
	Linolsäure	21,14	33,7	+/- 0,4	32,1	+/- 0,5	-1,6
	Palmitinsäure	25,22	38,1	+/- 0,5	41,2	+/- 0,7	3,0
Sambuci	Linolensäure	18,77	22,1	+/- 0,5	24,9	+/- 0,5	2,8
	Linolsäure	21,28	20,6	+/- 0,4	23,3	+/- 0,2	2,8
	Palmitinsäure	25,36	57,3	+/- 1,1	51,7	+/- 0,8	-5,6
Eruca	Linolensäure	18,78	13,8	+/- 0,3	11,9	+/- 0,1	-1,9
	Linolsäure	21,28	15,2	+/- 0,3	13,5	+/- 0,1	-1,7
	Ölsäure	25,32	35,9	+/- 0,6	34,9	+/- 0,4	-1,0
	Eicosensäure	31,64	10,8	+/- 0,2	11,1	+/- 0,0	0,2
	Erucasäure	41,36	24,3	+/- 0,4	28,6	+/- 0,4	4,3

10.5 Hemmung von Thrombin durch Fettsäuren und Fettsäuregemische

Die in den drei Drogenextrakten identifizierten Fettsäuren wurden gekauft und als gekaufte Reinsubstanzen auf ihre thrombinhemmende Wirkung untersucht. Gleichzeitig wurde untersucht, ob eine Mischung der Fettsäuren in dem Verhältnis, welches in Assaybedingungen vorliegt, zu einer synergistischen, überadditiven Hemmung führt.

Abbildung 32 zeigt die Hemmung von Thrombin durch die in den drei Drogen vorkommenden Fettsäuren sowie den entsprechenden Fettsäuregemischen. Da Palmitinsäure schwer löslich ist, wurde die Hemmung zusätzlich in der Konzentration 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ bestimmt, um die Fettsäuren vergleichen zu können.

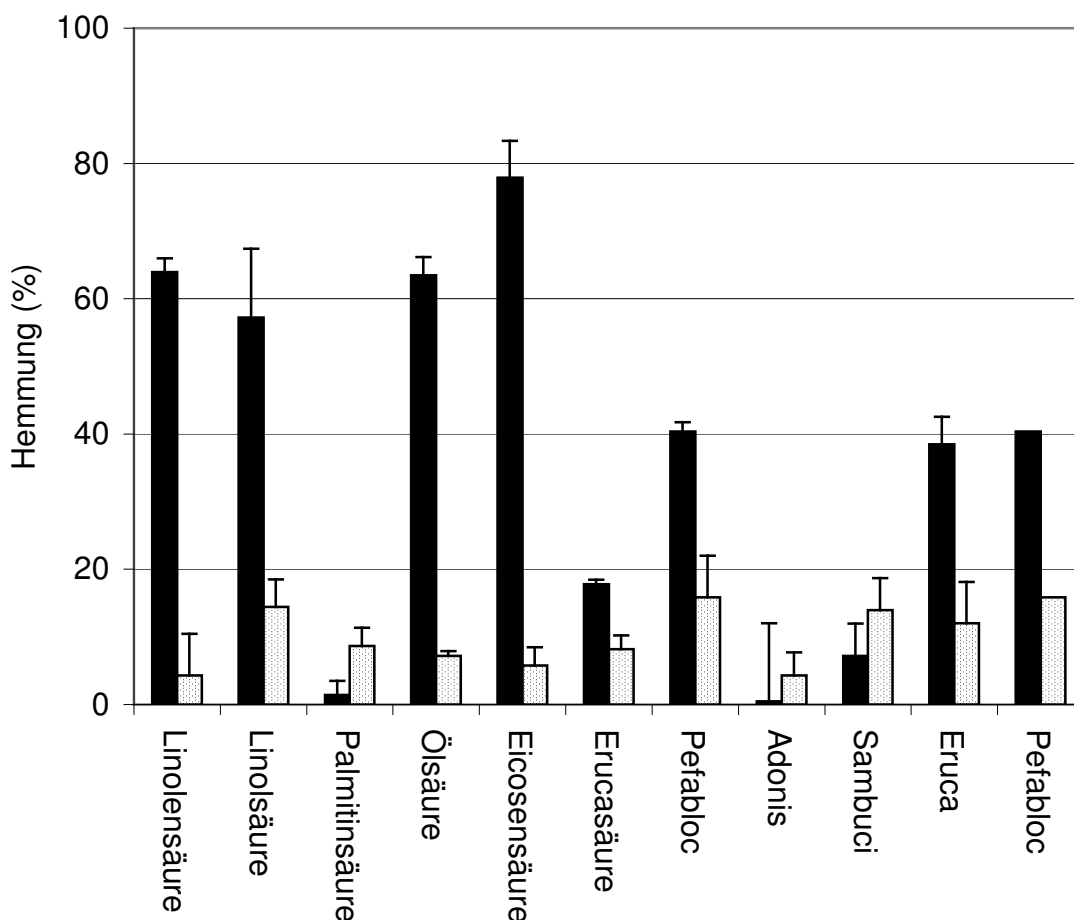


Abbildung 32: Hemmung von Thrombin durch Fettsäuren in der Konzentration 0,5 µmol/ml (schwarze Balken) und 0,1 µmol/ml (weiße Balken). Die Proben Adonis, Sambuci und Eruca stellen die Mischungen der Fettsäuren dar.

Abbildung 32 zeigt, daß Eicosensäure die größte Thrombinwirkung zeigt, gefolgt von Linolensäure, Linolsäure und Ölsäure. Palmitinsäure und Erucasäure zeigen kaum eine Wirksamkeit. Die Fettsäuremischungen zeigen keine synergistische Wirksamkeit.

10.6 Diskussion

Die für Sambuci und Eruca gefundenen Fettsäuren stimmen mit der Literatur überein [202,204]. Die Fettsäurezusammensetzung der Herba Droge von Adonis vernalis wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Auffällig in der Zusammensetzung der Fettsäuren ist, dass Linol und Linolensäure in allen 3 Drogenextrakten im ungefähren Verhältnis 1:1 vorlagen.

Eine einfache Mazeration führte zu einer prozentual höheren Extraktion der freien Fettsäuren im Vergleich zu einer selektiven Extraktion. Damit ist offensichtlich, daß die Fettsäuren überwiegend auf der Oberfläche der Drogen lokalisiert waren.

Der hohe Anteil der gesättigten und damit im wäßrigen Milieu schwer löslichen Palmitinsäure nach der Reextraktion aus den wäßrigen Assaybedingungen ist durch einen Emulgatoreffekt der beiden relativ gut löslichen Fettsäuren Linol- und Linolensäure zu erklären. Ein Problem war, daß es auch durch längere Zentrifugation nicht gelang, die Proben trübungsfrei zu zentrifugieren. Da jedoch ein deutlicher Rückstand nach der Zentrifugation zu erkennen war, hätte ein Trend erkennbar sein müssen.

Eicosensäure, Ölsäure, Linolensäure und Linolsäure zeigten eine Hemmung von Thrombin. Es handelt sich um Omega-11-, Omega-9-, Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren. Allen 3 Fettsäuren ist gemeinsam, dass die erste Doppelbindung an Position 9 liegt. Eine synergistische Hemmung des Thrombins durch eine Mischung der Fettsäuren konnte nicht beobachtet werden.

Eine eingehendere Diskussion der Hemmung von Thrombin durch die unterschiedlichen Fettsäuren erfolgt am Ende des nächsten Kapitels.

11 Die Hemmung von Thrombin durch Fettsäuren

11.1 Einleitung

Nachdem Fettsäuren als Inhibitoren des Thrombins erkannt wurden, war es nun das Ziel, durch die Testung weiterer Fettsäuren einen Einblick in mögliche Struktur/Wirkungs-Beziehungen zu bekommen. Dabei wurden in einer Serie die in Tieren und Menschen gebildeten Biosyntheseprodukte aus Öl-, Linol- und Linolensäure getestet. Aus Ölsäure bildet sich Eicosatriensäure, aus Linolsäure bildet sich Arachidonsäure und aus Linolensäure bildet sich Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure.

Öl- (18:1), Linol- (18:2) und Linolensäure (18:3) zeigten in den Drogenextrakten Wirksamkeit. Aus diesem Grund wurde mit Stearidonsäure (18:4) diese Reihe um eine weitere Substanz ergänzt und getestet.

Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure und Eicosensäure, die wirksamen Fettsäuren aus den Drogenextrakten, weisen als strukturelles Merkmal auf, daß die erste Doppelbindung an Position 9 beginnt. Daher wurden der gemeinsame Anfangsteil dieser Fettsäuren, Octansäure (8:0) und 9-Decensäure (9:1) auf ihre hemmende Wirkung untersucht. Schließlich wurden mit cis-Vaccensäure (18:1) und Elaidinsäure (18:1) Strukturisomere von Ölsäure untersucht.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen physikochemischen Eigenschaften der Fettsäuren und ihrer Thrombinhemmung zu überprüfen, wurden die zugänglichen Parameter verglichen.

Am Beispiel von Ölsäure wurde die Hemmung in Gegenwart eines anderen Enzyms, die Zeitabhängigkeit der Hemmung, der Einfluß der Inkubationszeit und der Einfluß der Inhibitorkonzentration auf die Hemmung untersucht.

11.2 Hemmung von Thrombin durch verschiedene Fettsäuren

Verschiedene Fettsäuren wurden auf ihre Thrombin hemmende Eigenschaften untersucht. Abbildung 33 fasst die Ergebnisse zusammen.

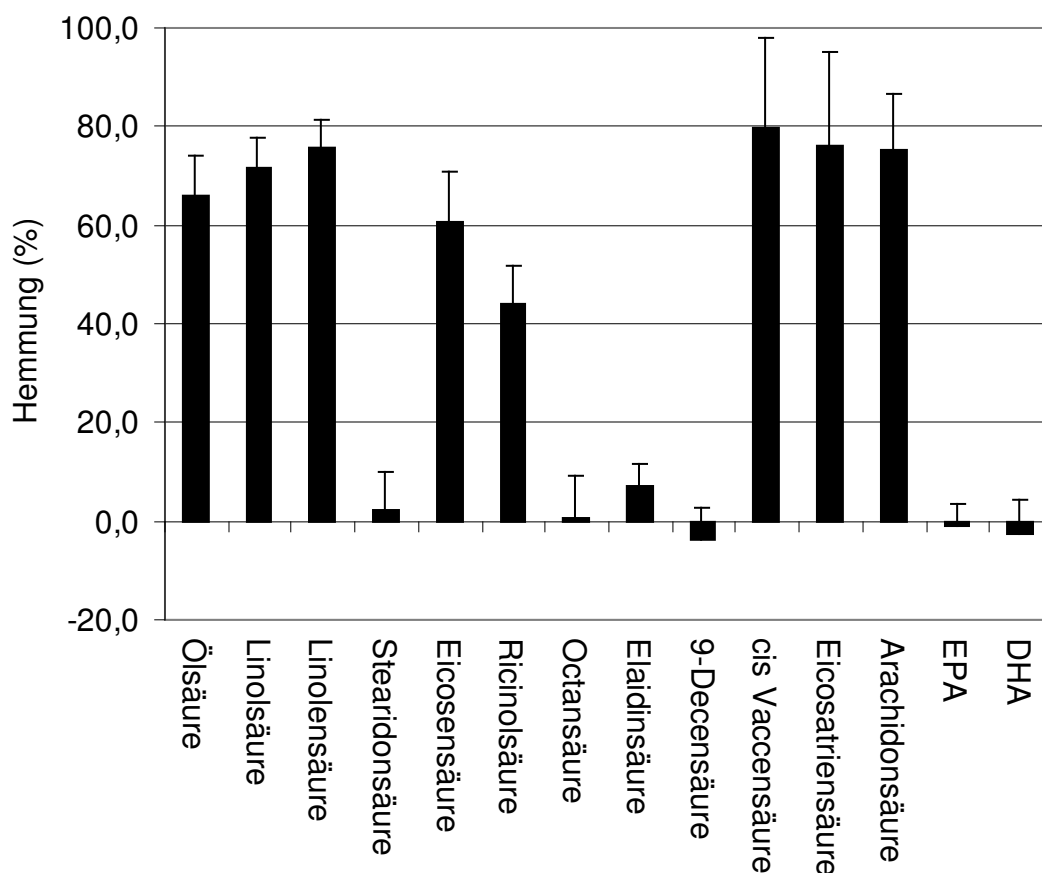


Abbildung 33: Hemmung von Thrombin durch verschiedene Fettsäuren in der Konzentration $0,5 \mu\text{mol/ml}$. Bei den Werten handelt es sich um den Durchschnitt von je 3 Werten pro Fettsäure, die an 3 verschiedenen Tagen gemessen wurden. Der Fehlerbalken gibt die einfache Standardabweichung an. EPA = Eicosapentaensäure, DHA = Docosahexaensäure; Palmitinsäure (Hemmung: 1,4 %) und Erucasäure (Hemmung: 17,8 %) wurden nicht mehr mitgetestet

Aus Abbildung 33 geht hervor, daß Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure, Eicosensäure, cis-Vaccensäure, Eicosatriensäure und Arachidonsäure eine Hemmung von Thrombin zeigen, die sich in etwa in der gleichen Größenordnung bewegt.

Die Hemmung des Thrombins durch Ricinolsäure fällt im Vergleich zu Ölsäure ab. Ricinolsäure hatte jedoch nur eine Reinheit von 80 %.

11.3 Physikochemische Eigenschaften der Fettsäuren

Nachdem keine klare Struktur-Wirkungs-Beziehung offensichtlich wurde, wurden die physikochemischen Eigenschaften der Fettsäuren miteinander verglichen, sofern sie zugänglich waren.

Die Daten wurden aus dem Sci Finder entnommen. Es handelt sich um theoretische Werte, die mit ACD Solaris® Vers. 4.67 berechnet wurden.

Der Biokonzentrationsfaktor indiziert, wie schnell sich eine Substanz bei dauerhafter Exposition in einem Organismus anreichert. Der organische Kohlenstoffabsorptionskoeffizient beschreibt das Verhältnis der Menge einer Substanz, die von Erde absorbiert wird, im Verhältnis zu der Menge, die im Wasser bleibt, bei der Zugabe dieser Substanz zu einer Erde-Wasser-Mischung. Der Unterschied zwischen logD und logP bei der Beschreibung des Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol und Wasser ist, daß der logP Wert für die neutrale Form berechnet wurde, während der logD Wert den Anteil der ionisierten Form einer Substanz bei einem bestimmten pH berücksichtigt [275]. Die Werte sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Physikochemische Eigenschaften der Fettsäuren, sortiert nach Zunahme der Hemmung; H. (%) = prozentuale Hemmung von Thrombin; BF = Biokonzentrationsfaktor bei pH 8; Koc = Organischer Kohlenstoff Absorptionskoeffizient bei pH 8; logD = Logarithmus des Octanol/Wasser Koeffizienten bei pH 8; logP = Logarithmus des Octanol/Wasser Koeffizienten; pKa = negativer Logarithmus der Dissoziationskonstanten für Säuren

Fettsäure	H. (%)	BF	Koc	log D	log P	pKa
9-Decensäure	-3,7	1	1.23	0,29	3.455±0.201	4.78±0.20
Docosahexaens.	-2,5	141	138	4.18	7.487±0.467	4.61±0.20
Eicosapentaens.	-1	53.9	75.4	3.58	6.764±0.418	4.77±0.20
Octansäure	0,7	1	1	-0.26	2.903±0.184	4.78±0.20
Palmitinsäure	1,4	109	126	3.99	7.154±0.185	4.78±0.20
Stearidonsäure	2,4	20.9	37.9	3.05	6.243±0.396	4.75±0.20
Elaidinsäure	7,4	283	249	4.53	7.698±0.199	4.78±0.20
Erucasäure	17,8	11700	3570	6.65	9.823±0.199	4.78±0.20
Ricinolsäure	43,9	8.58	20.4	2.53	5.701±0.219	4.78±0.20
Eicosensäure	60,7	1820	943	5.59	8.761±0.199	4.78±0.20
Ölsäure	65,8	323	284	4.59	7.698±0.199	4.78±0.10
Linolsäure	71,7	114	130	4.01	7.180±0.256	4.78±0.20
Arachidonsäure	75,2	130	142	4,09	7.267±0.396	4.77±0.20
Linolensäure	75,5	47.3	69.2	3.51	6.677±0.304	4.78±0.20
Eicosatriensäure	76	305	263	4.57	7.740±0.304	4.78±0.20
Vaccensäure	79,9	283	249	4.53	7.698±0.199	4.78±0.20

Die Daten aus Tabelle 9 machen deutlich, daß es keinen Zusammenhang zwischen den verglichenen physikochemischen Eigenschaften und der Hemmung von Thrombin gibt .

11.4 Inhibition in Gegenwart eines anderen Proteins

Die Hemmung von Thrombin durch Fettsäuren in Gegenwart des zufällig ausgewählten Enzyms beta-Glucosidase (E.C.3.2.1.21.) wurde untersucht. Ziel dieses Versuches war es, zu überprüfen, ob Ölsäure Thrombin selektiv hemmt. Dazu wurde beta-Glucosidase in zwei verschiedenen Konzentrationen zu der Probe mit Thrombin und dem Inhibitor hinzugegeben und die Aktivität anschließend vermessen.

Rinderthrombin hat ein Molekulargewicht von 36 kda [276]. Beta-Glucosidase aus der Mandel hat ein Molekulargewicht von 117 kda [277]. Unter den Testbedingungen befand sich 0,0005 mg Thrombin in Gegenwart von 0,5 beziehungsweise 1,0 mg beta-Glucosidase. Damit befand sich beta-Glucosidase in einem 330fachen, beziehungsweise 660fachen Überschuß.

Die Hemmung von Thrombin durch Ölsäure ohne und mit beta-Glucosidase in unterschiedlichen Konzentrationen ist in Abbildung 34 dargestellt.

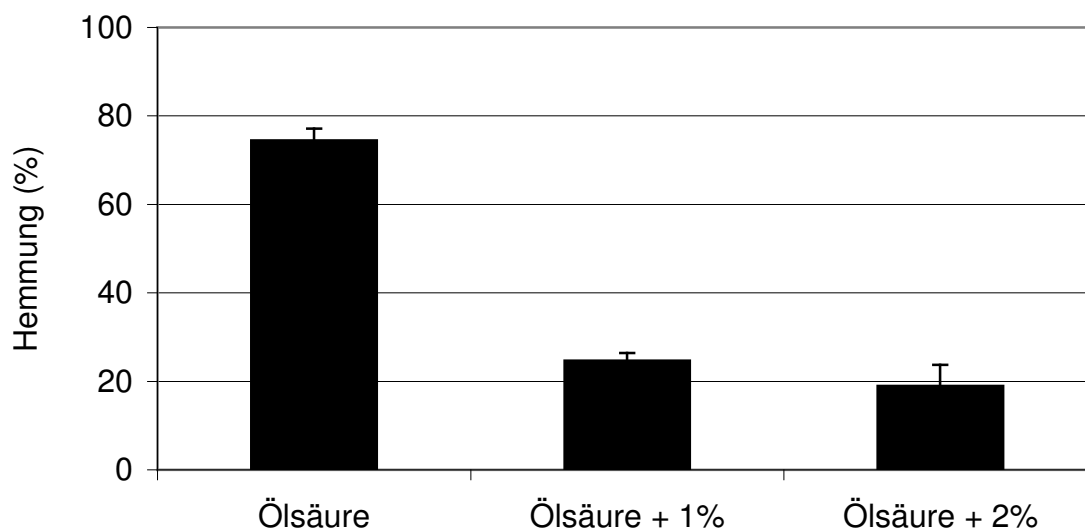


Abbildung 34: Deutliche Abnahme der Hemmung der Thrombininhibition durch Fettsäuren durch die Zugabe des Enzyms beta-Glucosidase in der Konzentration 1% und 2%.

Abbildung 34 zeigt, daß es zu einer Abnahme der Hemmung des Thrombins in Gegenwart von beta-Glucosidase kommt.

11.5 Reversible oder irreversible Inhibition ?

Ein Test auf irreversible Hemmung kann durch die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Hemmwirkung erfolgen [278]. Dabei bewirkt ein reversibler Inhibitor eine augenblickliche Hemmung des Enzyms und zeigt keine Zeitabhängigkeit. Ziel dieses Experiments war es herauszufinden, ob es sich bei Ölsäure um einen irreversiblen oder reversiblen Inhibitor handelt. Als Vergleich wurden der reversible Inhibitor Benzamidin und der irreversible Inhibitor Pefabloc SC verwendet. Thrombin wurde für die Dauer von 0 bis 165 Sek. mit den verschiedenen Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrats gestartet und nach 1 Min durch Zugabe von Essigsäure beendet (siehe Abb. 35)

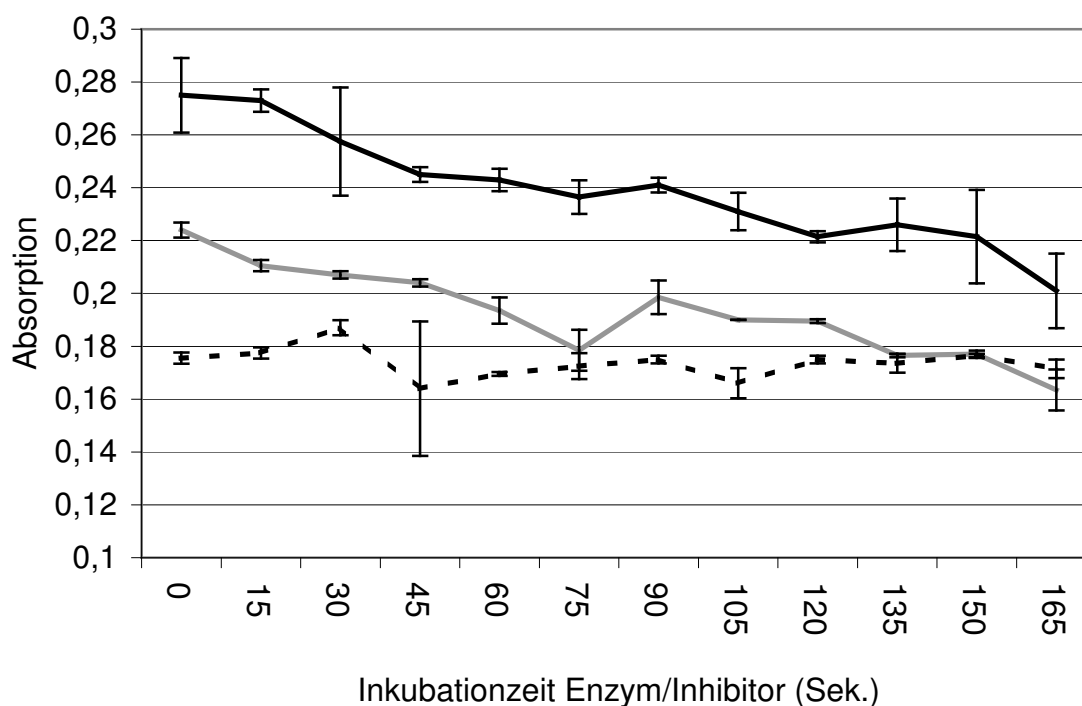


Abbildung 35: Zeitabhängigkeit der Hemmung von Thrombin durch Ölsäure (oben, schwarz), Pefabloc SC (mitte, grau) und Benzamidin (unten, gestrichelt).

Abbildung 35 zeigt, daß die Hemmung von Thrombin durch Ölsäure mit der Zeit zunimmt. Es kommt zu einer Absorptionsabnahme. Diese Eigenschaft zeigen auch irreversible Inhibitoren. Allerdings zeigen langsam bindende Inhibitoren die gleichen Eigenschaften [279].

11.6 Zeitabhängigkeit der Hemmung

Ein Charakteristikum von langsam bindenden Inhibitoren ist die Tatsache, daß das Ausmaß der Hemmung bei einer fixen Inhibitorkonzentration mit der Zeit variiert [280]. Die Betrachtung der Verlaufskurve der Absorptionszunahme bringt darüber Aufschluß. Eine typischen Verlaufskurve langsam bindender Inhibitoren zeigt eine „initial“ und eine „steady state“ Geschwindigkeit, die sich deutlich unterscheiden.

Abbildung 36 zeigt die Absorptionszunahme in Gegenwart von Ölsäure und ohne Gegenwart eines Inhibitors.

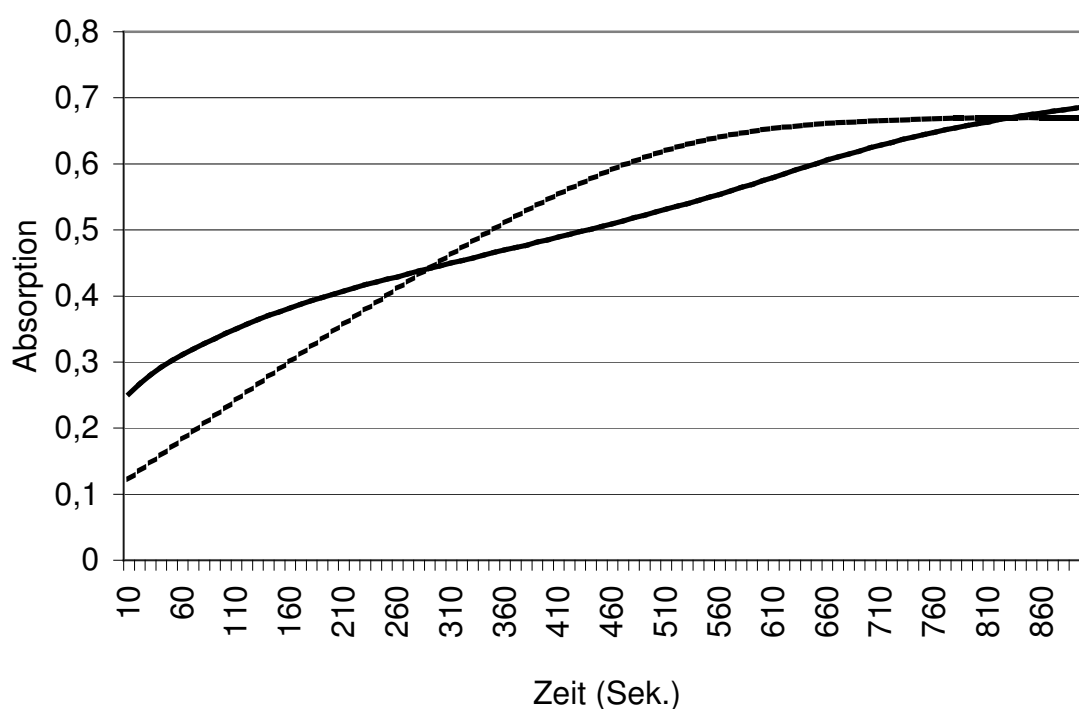


Abbildung 36: Absorptionszunahme durch Umsetzung des Substrats; Blindwert (gestrichelt), Ölsäure (schwarz; $c = 0,5 \mu\text{mol/ml}$) - Inkubation mit Enzym, Start durch Zugabe des Substrats

Abbildung 36 offenbart folgendes: Ölsäure zeigt bis 460 Sekunden den Kurvenverlauf von langsam bindenden Inhibitoren. Ungewöhnlich ist jedoch die Zunahme der Geschwindigkeit im hinteren Bereich der Kurve.

Tabelle 10 zeigt, daß es im hinteren Bereich des Kurvenverlaufes wieder zu einer Zunahme der Umsatzgeschwindigkeit kommt.

Tabelle 10: Ölsäure zeigt erst eine Abnahme der Umsatzgeschwindigkeit und später wieder eine Zunahme; Geschwindigkeit = Absorptionszunahme pro 10 Sek.

Zeitraum (Sek)	10 - 40	210 - 240	410 - 440	610 - 640
Geschwindigkeit	0,0126	0,0045	0,0040	0,0052

11.7 Einfluß der Inkubationszeit

Der Einfluß der Inkubationszeit im Zeitraum zwischen 0 – 165 Sek wurde bereits unter Punkt 11.5 bestimmt. Für sämtliche Aktivitätstests wurde allerdings der Inhibitor oder die Probe mit dem Enzym für 15 Minuten inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe des Substrats gestartet wurde. Hier sollte der Einfluß einer 1,2,4,7,10 und 15minütigen Inkubationszeit bestimmt werden. Die Ergebnisse werden in Abbildung 37 zusammengefaßt.

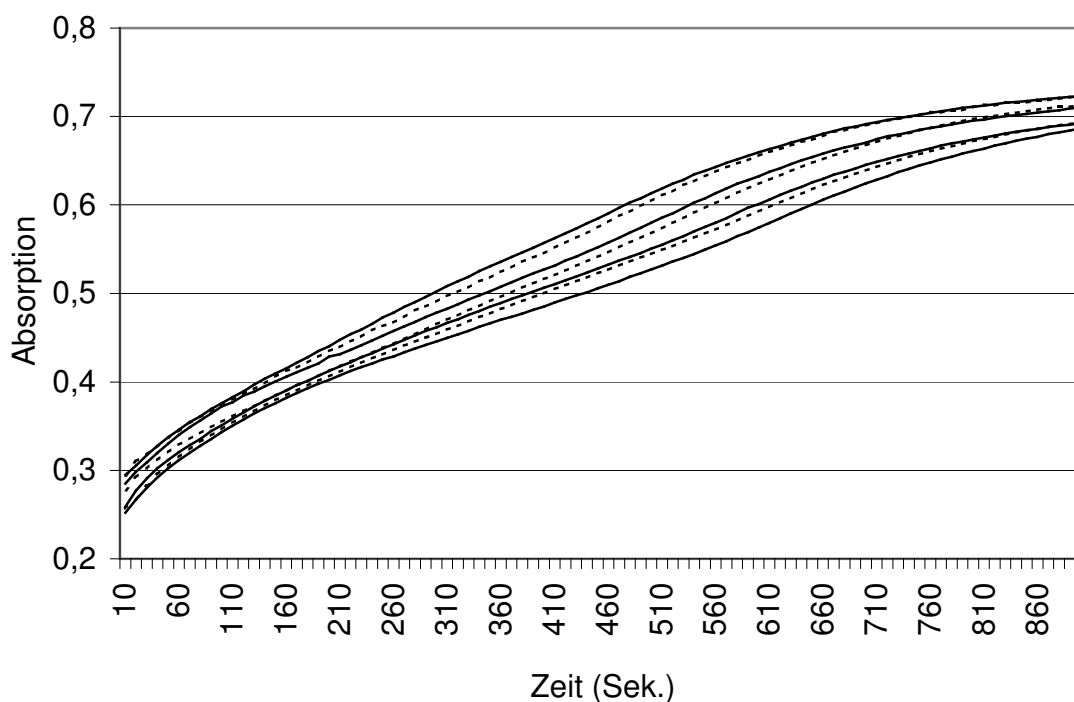


Abbildung 37: Zunahme der Hemmung durch längere Inkubationszeit. Die Linien von unten nach oben, repräsentieren eine Inkubationszeit von 15, 10, 7, 4, 2, 1, 0 Minuten; Konzentration Ölsäure = 0,5 $\mu\text{mol/ml}$

Die Ergebnisse aus Abbildung 37 lassen erkennen, daß die Anfangsgeschwindigkeit von der Dauer der Inkubationszeit unabhängig zu sein scheint. Im weiteren Verlauf der Reaktion kommt es jedoch in Abhängigkeit der Inkubationszeit zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit.

11.8 Einfluß der InhibitorKonzentration auf die Hemmung

Die Reinsubstanzen wurden in der Konzentration 0,5 $\mu\text{mol/ml}$ vermessen. Hier sollte der Einfluß der Konzentration auf die Hemmung des Thrombins untersucht werden. Dazu wurde der Kurvenverlauf von Ölsäure der Konzentration 0,5 $\mu\text{mol/ml}$ mit der Konzentration 1,0 $\mu\text{mol/ml}$ verglichen (Abb. 38).

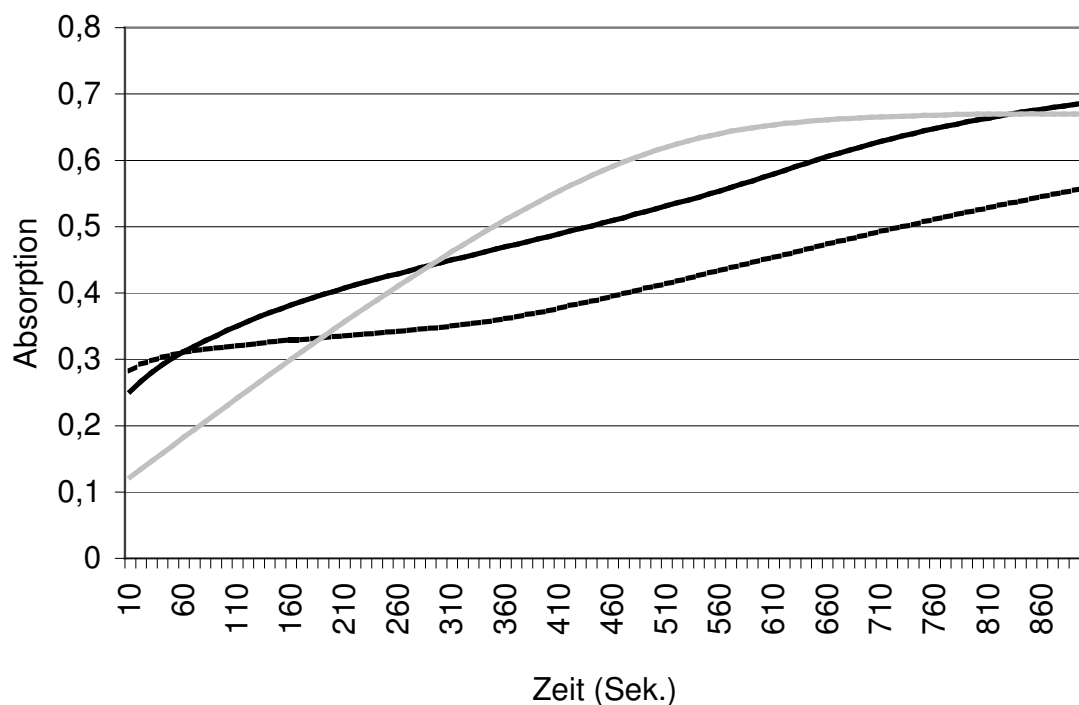


Abbildung 38: Zunahme der Inhibition durch Zunahme der InhibitorKonzentration; Ölsäure 0,5 $\mu\text{mol/ml}$ = schwarz; Ölsäure 1 $\mu\text{mol/ml}$ = gestrichelt; Blindwert = grau

Wie aus Abbildung 38 hervorgeht, ist die „steady state“ Geschwindigkeit bei der Konzentration 1 $\mu\text{mol/ml}$ deutlich geringer. Der Kurvenverlauf ist jedoch analog.

11.9 Einfluß der Änderung der Testbedingungen

In sämtlichen Aktivitätstests wurde Thrombin mit dem Inhibitor für 15 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats gestartet. Diese Vorgehensweise wurde dahingehend geändert, daß das Substrat zusammen mit dem Inhibitor für 30 Sekunden inkubiert wurde, und die Reaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet wurde. Die Kurvenverläufe sind in Abbildung 39 dargestellt.

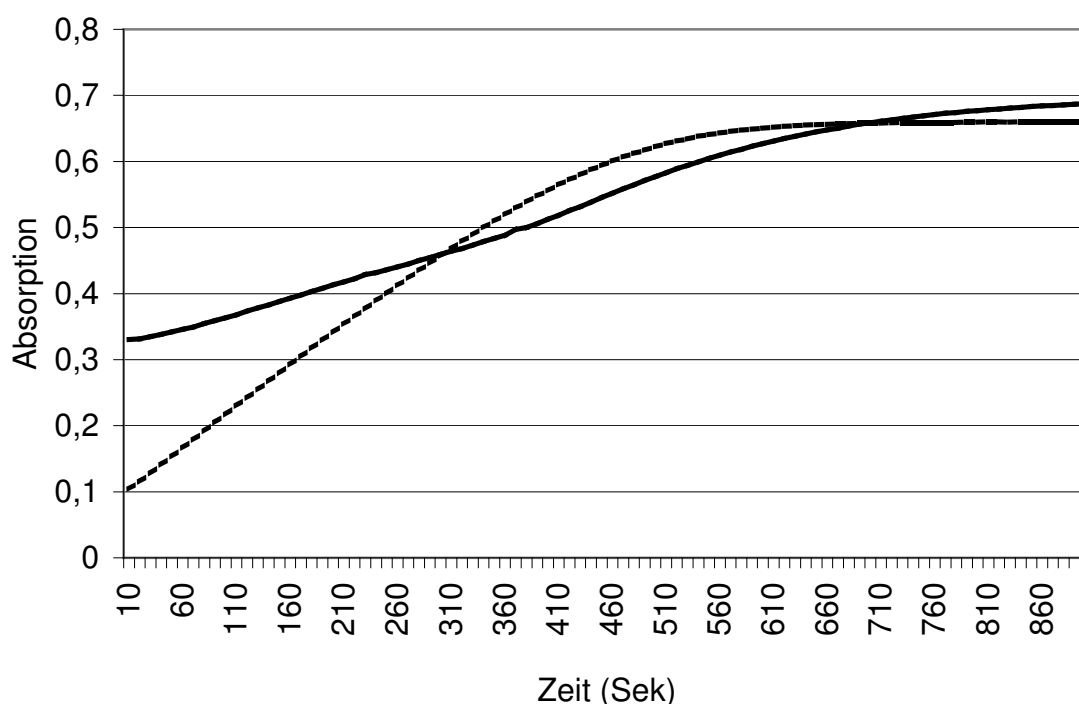


Abbildung 39: Blindwert (gestrichelt), Ölsäure (schwarz; $c = 0,5 \mu\text{mol/ml}$), – Inkubation des Substrats, Start durch Zugabe des Enzyms

Aus Abbildung 39 geht hervor, daß es durch die veränderten Testbedingungen, trotz verkürzter Inkubationszeit, zu einer augenblicklichen Hemmung kommt. Auch hier nimmt der Substratumsatz mit der Zeit zu (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Reaktionsdauer

Zeit (Sekunden)	20 - 50	320 - 350
Geschwindigkeit	0,0036	0,0051

11.10 Geht Ölsäure in die Bindetasche ?

Ziel dieses Experimentes war es, die Frage zu klären, ob Ölsäure die Bindetasche des Thrombins blockiert. Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurden zwei verschiedene

Ansätze gewählt, die gleichermaßen auf der Idee beruhen, daß ein starker Thrombininhibitor Ölsäure aus der Bindetasche verdrängt.

Bei dem ersten Versuch wurde Thrombin zusammen mit Ölsäure inkubiert und nach 20 Minuten ein Inhibitor vom 4-Amidinophenylalanin Typ hinzugegeben. Für die Blindprobe wurde Thrombinpuffer dazupipettiert. Das Enzym, und damit auch die gebundenen Substanzen, wurden mit Gerbstoffen gefällt. Der Überstand wurde anschließend chromatographisch vermessen. Würde Ölsäure aus der Bindetasche verdrängt werden, so wäre der Ölsäurepeak nach Zugabe des Inhibitors größer. Tabelle 12 zeigt, daß die AUC für Ölsäure durch Zugabe des Inhibitors kleiner wird.

Tabelle 12

	AUC des Ölsäurepeaks (AU*Min)
Zugabe des Thrombininhibitors	0,017475
Zugabe von Puffer	0,029096

Tabelle 12 zeigt, daß der Ölsäurepeak durch die Zugabe des Thrombininhibitors um 40 % kleiner wird.

Für den zweiten Versuch sollte wieder der Thrombininhibitor Ölsäure aus der Bindetasche verdrängen. Die Abtrennung des Enzym-Inhibitor Komplexes sollte jedoch durch Chromatographie erfolgen. Die verwendete Nucleordur gravity Säule hat eine Porenweite von 110 Angström [281]. Thrombin hat eine Größe von ca. 50 Angström (berechnet mit Pymol Version 0.98). Aufgrund des „Siebeffekts“, einer Klassierung nach Molekülgrößen, würde der Enzym-Inhibitor-Komplex früh eluieren, der Ölsäurepeak würde später eluieren. Der Blindwert wurde wieder durch Zugabe von Puffer statt Inhibitor bestimmt. Tabelle 13 zeigt, daß auch hier die AUC für Ölsäure durch Zugabe des Inhibitors kleiner wird.

Tabelle 13

	AUC des Ölsäurepeaks (AU*Min)
Zugabe des Thrombininhibitors	0,010981
Zugabe von Puffer	0,012084

Tabelle 13 zeigt, daß der Ölsäurepeak durch die Zugabe von Inhibitor um 9,1 % abnimmt.

11.11 Diskussion

Die wirksamen Fettsäuren weisen als gemeinsames Strukturmerkmal eine Doppelbindung in Position 11 (Vaccen-, Eicosatrien-, Arachidon- und Eicosensäure) oder 9 (Öl-, Linol- und Linolensäure) auf.

Die Wirksamkeit der Fettsäuren, die in Position 9 eine Doppelbindung haben, nimmt von Öl- (18:1) zu Linolensäure (18:3) zu. Linol- und Linolensäure haben zusätzlich noch eine Doppelbindung in Position 12.

Die Wirksamkeit der Fettsäuren, die in Position 11 eine Doppelbindung haben, nimmt von Vaccen- (18:1) zu Arachidonsäure (20:4) ab. Allerdings nimmt die Wirksamkeit auch von Vaccen- (18:1) zu Eicosensäure (20:1) ab. Dies läßt den Schluß zu, daß eine Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen optimal für eine Wirksamkeit zu sein scheint.

Mit jeder zusätzlichen Doppelbindung verliert das Molekül an Flexibilität. Stearidonsäure und Eicosapentaensäure sind nicht wirksam, obwohl sie eine Doppelbindung an Position 9, bzw. 11 besitzen. Beiden Fettsäuren ist gemeinsam, daß sie eine höhere Anzahl von Doppelbindungen haben als die wirksamen Verbindungen ihrer homologen Reihe. Offensichtlich ist gleichermaßen eine gewisse Flexibilität des Moleküls für seine Wirksamkeit wichtig.

Die Kriterien für eine Wirksamkeit sind zusammengefaßt folgende: eine Doppelbindung in Cis, eine Kettenlänge von 18, eine Doppelbindung in Position 9 – 12 (wobei 11 optimal zu sein scheint) und eine gewisse Flexibilität des Moleküls.

Die Hemmung von Thrombin durch Ölsäure erfolgt zeitabhängig. Die Inkubationszeit steigert die Hemmung. Die gleiche Beobachtung wurde für die Hemmung von Pyruvat Carboxylase durch Oleat gemacht [282].

Die Zunahme der Hemmung mit der Zeit deutet auf einen langsam bindenden Inhibitor hin [280]. Der sigmoide Kurvenverlauf deutet auf eine allosterische Hemmung hin. Möglich ist eine negative, heterotropische Kooperativität [278].

Startet man den Aktivitätstest durch Zugabe des Enzyms, statt durch Zugabe des Substrats, entfällt der Anfangsteil, in dem hohe Substratumsätze erfolgen, trotz Beschränkung der Inkubationszeit auf 30 Sekunden. Substrat und Ölsäure liegen in

hohem Überschuß im Verhältnis zum Enzym vor. Möglich ist, daß es durch die Umsetzung des Substrats zu einer Konformationsänderung des Enzyms kommt. Eine unterschiedliche Affinität von Thrombininhibitoren zu verschiedenen Konformationszuständen wurde bereits beschrieben [283].

Dazu passt auch die Beobachtung, daß Ölsäure eine höhere Affinität zu dem Thrombin zu haben scheint, welches zusätzlich noch einen Inhibitor gebunden hat. Dass der Inhibitor nicht in der Lage war, Ölsäure wieder freizusetzen, kann folgende Gründe haben: Ölsäure bindet nicht in der Bindetasche oder zumindestens nicht an Stellen die der Inhibitor ausfüllt, der Inhibitor ist zu schwach um Ölsäure zu verdrängen oder Ölsäure bindet kovalent. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß der Test mit einem für diese Zwecke unempfindlichen PDA-Detektor durchgeführt wurde und die Daten nicht statistisch gesichert sind.

Die Hemmung von Thrombin nimmt in Gegenwart von β -Glucosidase ab. Ob die Wechselwirkung zwischen Ölsäure und β -Glucosidase spezifisch ist, wurde nicht geklärt. Allerdings ist bekannt, daß Fettsäuren eine hohe Plasmaeiweißbindung haben.

Die Inhibition von Enzymen durch Fettsäuren wurde in der Literatur beschrieben. Linol-, Linolen-, Docosahexaen- und Eicosapentaensäure hemmen die Cyclooxygenasen 1 und 2. Ölsäure und Palmitinsäure zeigen keine Hemmung [284]. Erucasäure und Ölsäure zeigen eine Hemmung der humanen neutrophilen Elastase. Palmitinsäure und Stearinsäure zeigen eine Hemmung der Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* [285].

Aufgrund der Vielzahl der Enzyme, die durch Fettsäuren inhibiert werden, wird eine Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur durch einen Lösungsmittelleffekt angenommen [286]. Andere Gruppen schließen dies aus [287,288]. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, daß Fettsäuren bei pH 8 (Testbedingungen) keine Mizellen ausbilden, sondern lamellar vorliegen [289]. Weiterhin zeigte sich kein Zusammenhang zwischen verschiedenen physikochemischen Eigenschaften der Fettsäuren und und ihrer Hemmung von Thrombin.

12 Entwicklung eines Gerbstofffällungsassays für Thrombin

12.1 Einleitung

Ein entscheidender Aspekt beim Screening von Substanzgemischen ist die Identifizierung der aktiven Verbindung. Im Falle von Pflanzenextrakten geschieht dies üblicherweise durch eine aufwändige wirkorientierte Fraktionierung, bis im letzten Schritt die Isolierung erfolgt.

Eine alternative Herangehensweise besteht darin, das Substanzgemisch mit dem Targetprotein zu inkubieren und die entstandenen Protein-Inhibitor-Komplexe abzutrennen. Mögliche Methoden hierzu sind die Verwendung von Größenausschlußchromatographie [290] oder die Verwendung von Ultrafiltration [291,292]. Eine anschließende chromatographische Analyse des zerstörten Enzym-Inhibitor Komplexes liefert, je nach verwendetem Detektor, Informationen wie Retentionszeit, UV-Spektrum oder die Masse der gebundenen Substanz.

Es ist bekannt, dass Gerbstoffe mit Proteinen reagieren und die entstehenden Niederschläge in Wasser nicht löslich sind. Durch Zentrifugation können diese Niederschläge von anderen sich in der Lösung befindlichen Bestandteilen abgetrennt werden. Es zeigte sich, dass Enzyme, die aus Enzym-Gerbstoff Niederschlägen wiedergewonnen wurden, in ihren biologischen Eigenschaften unverändert blieben [293,294]. Die Rückgewinnung des Proteins gelang durch Zugabe von Reagenzien, die mit Gerbstoffen wechselwirken, wie beispielsweise Coffein [295]. In einem Vergleich verschiedener Reagenzien zur Wiedergewinnung der Enzymaktivität war PVP am effektivsten [95].

Es zeigte sich, daß die Struktur von Proteinen, die mit Polyphenolen wechselwirkten, unverändert bleibt [68,296,297]. Die initiale Protein-Polyphenol Interaktion ist reversibel [239]. Die Hemmung von beta-Glucosidase durch Gerbstoff erfolgt nicht-kompetitiv [298]. Beta-Glucosidase hat in einem Gerbstoff-Enzym-Komplex eine Restaktivität von 60 % [95]. Die Bindung von Gerbstoffen an Protein findet an der Oberfläche statt [257].

Diese Punkte deuten daraufhin, dass die Struktur der Bindetasche eines Enzyms während der Wechselwirkung mit Polyphenolen unverändert bleibt. Butler und

Hagerman verglichen die Wechselwirkung zwischen Polyphenolen und Proteinen mit Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen [234]. Ähnlich eines Immunoprecipitationsassays sollten hier die affinen Substanzen gefunden werden. Die Wechselwirkungen von Gerbstoffen mit Proteinen sind schematisch in Abbildung 40 dargestellt.

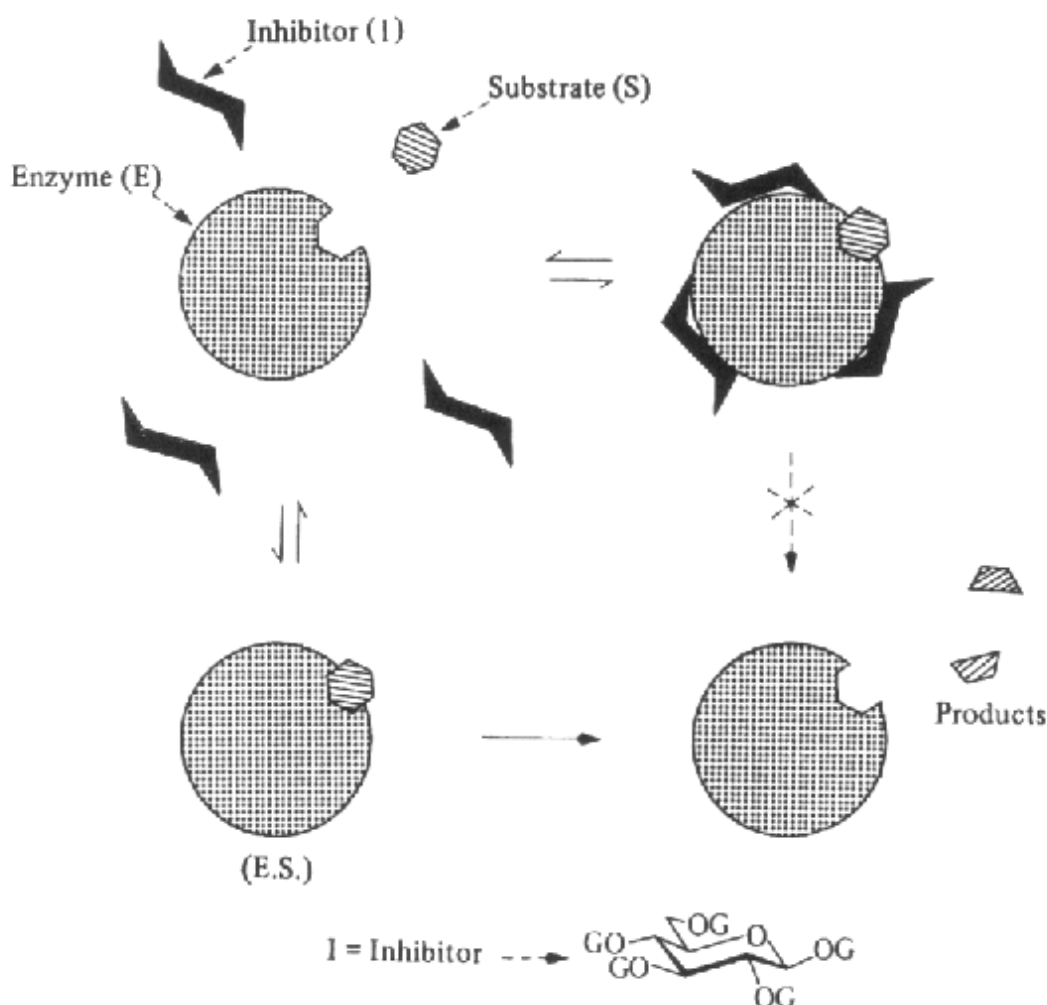


Abbildung 40: Nicht-kompetitive Enzymhemmung durch Polyphenole (aus Ozawa [298])

Ziel dieses Versuches war es nun, sich die Bildung von schwer löslichen Gerbstoff-Protein-Komplexen zu Nutze zu machen, um Protein-Inhibitor-Komplexe auszufällen. In einem ersten Schritt sollte ein Enzym-Inhibitor-Komplex gebildet werden. Dieser Komplex sollte dann mit Gerbstoffen gefällt und durch Zentrifugation von der Matrix abgetrennt werden. Durch Zugabe von Polyvinylpyrrolidon und eines Trifluoressigsäure/Methanol/Wasser Gemisches sollten die Gerbstoffe entfernt und die Struktur des Proteins zerstört werden. Nach einer erneuten Zentrifugation sollte das

Filtrat dann den gesuchten Inhibitor enthalten. Abbildung 41 fasst das Prinzip des Assays zusammen.

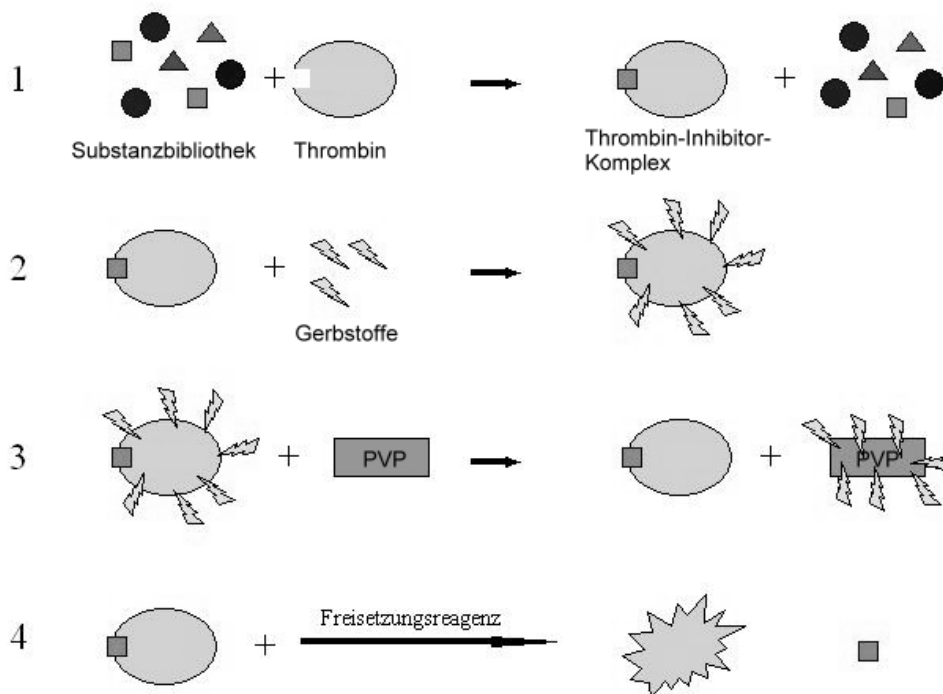


Abbildung 41: Prinzip des Gerbstofffällungsassays. 1: Bildung des Enzym/Inhibitor-Komplexes; 2: Fällung des Komplexes mit Gerbstoffen; 3: Bindung der Gerbstoffe an Polyvinylpyrrolidon (PVP); 4: Freisetzung des gebundenen Inhibitors

12.2 Anwendung auf eine Substanz-Inhibitor-Bibliothek

Für die Überprüfung der Hypothese wurde das Enzym Rinderthrombin (50 i.E./mg) verwendet. Als Substanzbibliothek dienten Arzneistoffe, zu denen ein Thrombininhibitor vom 4-Amidinophenylalanintyp mit einem K_i von 0,42 $\mu\text{mol/l}$ hinzugegeben wurde.

Die Substanzbibliothek wurde zusammen mit Thrombin inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine Gerbstofflösung zur Fällung des Proteins hinzugegeben. Nachdem zentrifugiert wurde, wurde der Rückstand 2 Mal gewaschen und jeweils wieder zentrifugiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurde ein Freisetzungsreagenz (Methanol/Wasser/Trifluoressigsäure; 49,5/49,5/1) und eine Spatelspitze Polyclar AT® (= unlösliches Polyvinylpyrrolidon) hinzugegeben. Die Probe wurde gemischt und anschließend für 5 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Hiernach wurde erneut

zentrifugiert und das Filtrat chromatographisch in Kombination mit einem PDA Detektor vermessen.

Abbildung 42 zeigt das Chromatogramm der Substanzbibliothek vor und Abbildung 43 nach der Verwendung des Gerbstofffällungsassays an.

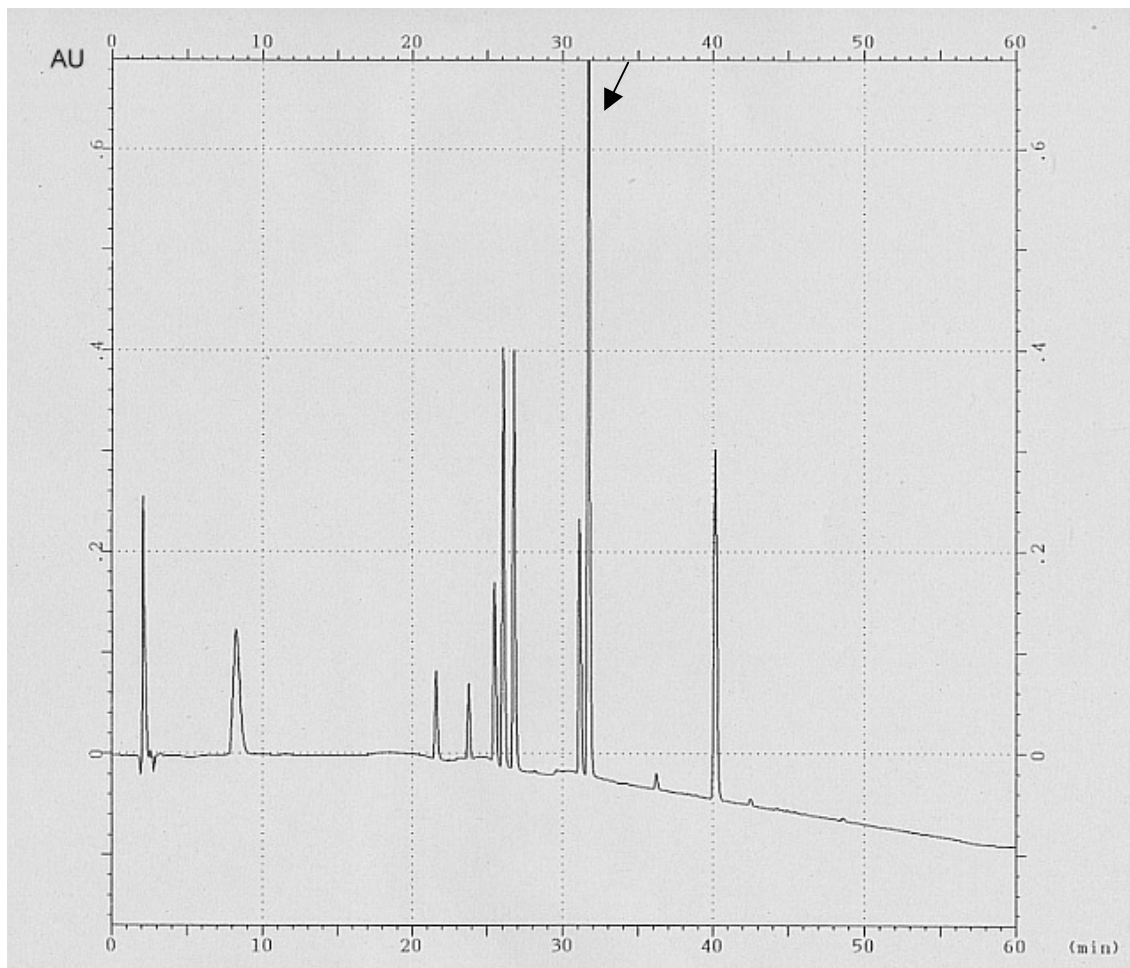


Abbildung 42: Chromatogramm der Substanzbibliothek bei der Wellenlänge 220 nm; Konzentration jeder Substanz 0,2 $\mu\text{mol/ml}$

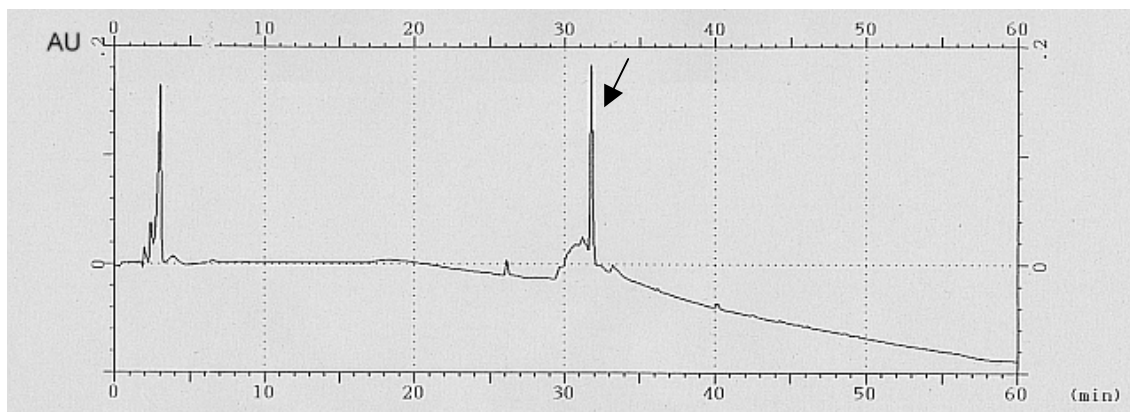


Abbildung 43: Chromatogramm nach der Freisetzung; bei dem mit Pfeil markierten Peak handelt es sich um den zugemischten Inhibitor

Das Chromatogramm in Abbildung 43 zeigt die Retentionszeit des gesuchten Inhibitors an. Störungen im Chromatogramm kommen durch ungereinigtes Polyclar AT®, Protein- und Gerbstoffreste zustande. Weitere Informationen über den gesuchten Inhibitor liefert das UV-Spektrum, welches erlaubt, zwischen dicht nacheinander eluierenden Substanzen zu unterscheiden. Abbildung 44 zeigt die UV Spektren der Peaks in Abbildung 42 zwischen Minute 30 und 35. Abbildung 45 zeigt das UV Spektrum der freigesetzten Substanz.

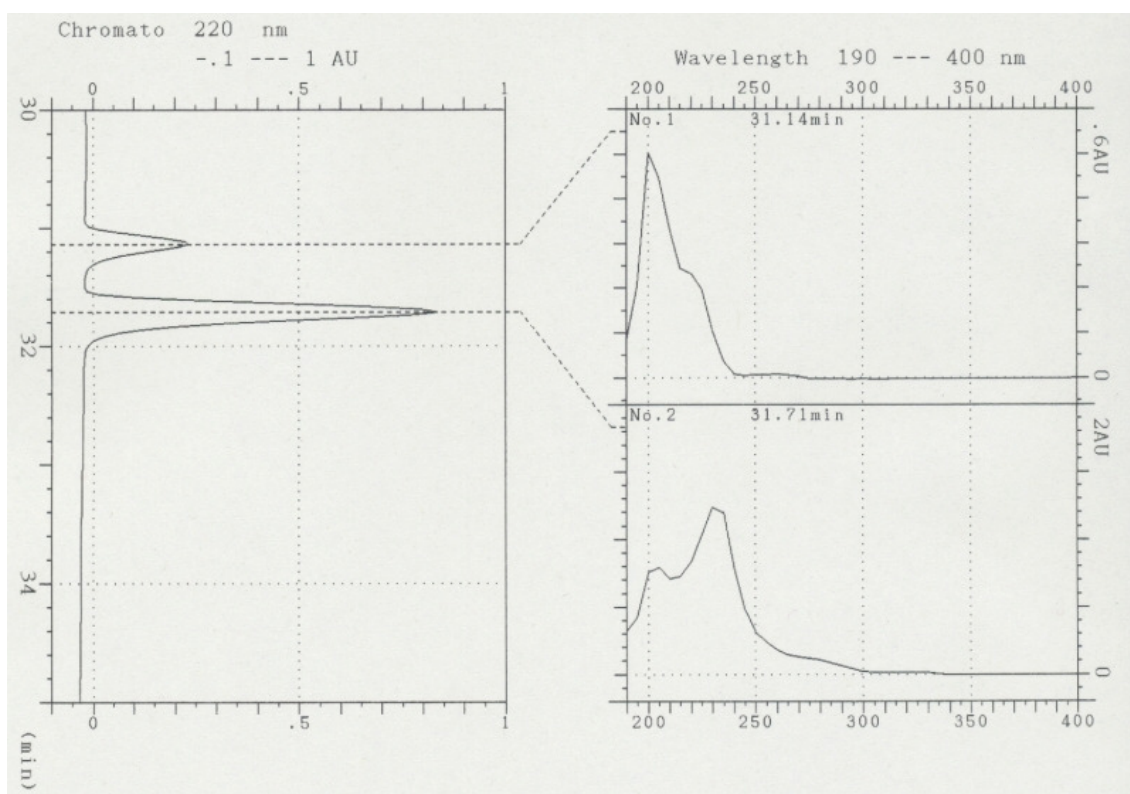


Abbildung 44: UV Spektren der Substanzen zwischen Minute 30 – 35

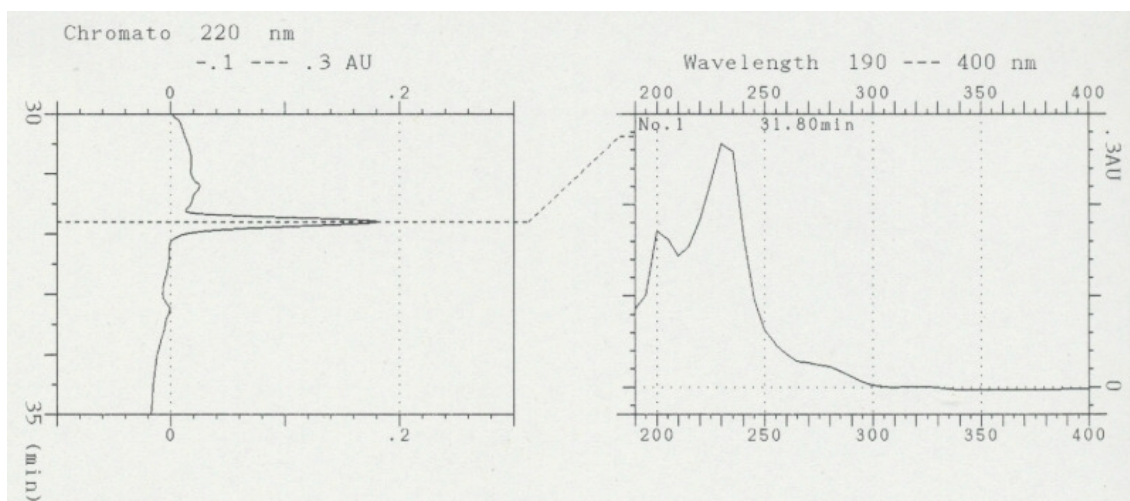


Abbildung 45: UV Spektrum der freigesetzten Substanz.

Aus den Abbildung 44 und 45 geht hervor, daß die Betrachtung des UV Spektrums die eindeutige Identifizierung des gesuchten Inhibitors erlaubt.

12.3 Diskussion

Der entwickelte Assay ist geeignet, um einen Inhibitor in einer Substanzbibliothek zu finden. Der Assay war dabei schnell durchzuführen und preiswert in den verwendeten Materialien. Aufgrund der fehlenden methodischen Einschränkung kann dieser Assay mit beliebigen Mengen Inhibitor, Protein und Gerbstoff durchgeführt werden. Dies ermöglicht die Verwendung von konventioneller HPLC. Die Wechselwirkung zwischen Gerbstoff und Protein führt neben einer Verminderung der Löslichkeit zu einer Erhöhung des Molekulargewichts des Proteins. Dies erleichtert die Abtrennung des Gerbstoff-Protein Komplexes. Die Durchführung gelang mit einer einfachen Zentrifuge. Aufgrund der hohen eingesetzten Enzymmengen gilt der Kostenvorteil allerdings nicht für teure Proteine. Ob dieser Assay auf andere Enzyme als Thrombin übertragbar ist, wurde nicht geklärt. Notwendige Voraussetzung auf Seiten des Proteins ist das Vorhandensein von Prolin [233,239].

Der Test würde in folgenden Fällen falsch positive Ergebnisse zeigen. Erstens: Eine Substanz wechselwirkt unspezifisch mit dem Enzym, zweitens: eine Substanz wechselwirkt mit dem Gerbstoff. Diese falsch positiven Ergebnisse könnten folgendermaßen eliminiert werden. Durch parallele Durchführung des Assays mit Rinderserumalbumin oder einem anderen Protein kann eine unspezifische Wechselwirkung eliminiert werden. Durch Variation der Enzymmenge könnte festgestellt werden, ob eine Substanz lediglich durch Gerbstoffe gefällt wird. Bei letzterem wäre der Peak im Chromatogramm immer gleich groß. Eine andere Möglichkeit, beide falsch positiven Ergebnisse gleichzeitig zu eliminieren, wäre, einen stärkeren Inhibitor für die Freisetzung des Inhibitors zu verwenden.

13 Zusammenfassung und Bewertung

Das Ziel dieser Arbeit war die Isolierung von Thrombininhibitoren aus Pflanzen. Mittels durchgeführten Screenings unter Verwendung verschiedener Eliminationsschritte gelang es, aussichtsreiche Pflanzen für die weitere Bearbeitung zu finden. Da jedoch bereits in drei der untersuchten Pflanzen freie Fettsäuren das wirksame Prinzip darstellten, erscheint es für zukünftige Screenings sinnvoll, noch einen Entfettungsschritt oder ähnliches zur Entfernung von Fettsäuren als Eliminationsschritt zu integrieren. Daneben wäre vielleicht auch ein alternatives Extraktionsverfahren sinnvoll, da die Extraktion von gepulverten Drogen im Ultraschallbad primär leicht lösliche und extrazelluläre Substanzen extrahiert, wie die Beispiele Gerbstoffe und Fettsäuren zeigen.

Die Evaluierung verschiedener Fällungsmethoden zur Entfernung von Gerbstoffen haben den Einfluß diverser Parameter wie pH und Lösungsmittel, sowie den Einfluss dieser Methoden auf andere phenolische Substanzen gezeigt. Die Fällung der Gerbstoffe mittels Polyvinylpyrrolidon war unter den gewählten Bedingung zur Fällung von Gerbstoffen geeignet. PVP fällte keine anderen Phenole und der Einfluss auf die Aktivität von Thrombin war gering. Die Verwendung von Bleiacetat als Gerbstofffällungsreagenz ist innerhalb eines Screenings ungeeignet. Insgesamt sind Fällungsmethoden einfach, schnell und in großer Anzahl zu realisieren, so daß ihr Einsatz bei Testung von Drogenextrakten leicht durchzuführen ist.

Eine Mischung oligomerer bis polymerer kondensierter Gerbstoffe zeigte unterschiedliche Affinität zu verschiedenen Proteinen. Da jedoch keine detaillierte Analyse gelang, konnte keine Aussage über die strukturelle Zusammensetzung getroffen werden. Bei der Wechselwirkung handelt es sich wahrscheinlich eher um eine gewisse Spezifität, als um eine hohe Selektivität. Es ist fraglich, ob kondensierte Gerbstoffe aus dem Darm intakt resorbiert werden können. Vor dem Hintergrund der Schwierigkeit der Analyse von polymeren Gerbstoffen ist dies aber nicht auszuschließen. Direkte Effekte durch Gerbstoffe auf Enzyme der Gerinnungskaskade könnten demnach einen Teilaspekt von kardiovaskulär protektiven Ernährungsweisen bilden.

Die Zusammensetzung der freien Fettsäuren in Herba Adonidis, Semen Erucae und Flores Sambuci wurde bestimmt. Von diesen und anderen Fettsäuren wurde die Hemmwirkung auf Thrombin untersucht. Einige Fettsäuren zeigten eine Hemmung von

Thrombin, jedoch konnte keine klare Struktur-Wirkungs-Beziehung erkannt werden. Auch der Mechanismus der Hemmung konnte nicht geklärt werden, allerdings ist die Hemmung nicht einfach reversibel. Ob die Hemmung von Thrombin ein weiterer Mosaikstein, zusätzlich zu den erwiesenen günstigen Einflüssen diverser Fettsäuren auf kardiovaskuläre Ereignisse darstellt, ist unklar. Allerdings ist zu beachten, dass die aktivierte Thrombozytenmembran die Oberfläche für Schlüsselprozesse der Blutgerinnung bildet. Es zeigte sich, dass Prothrombin und Faktor X stark an Membranen binden [299]. Eine mögliche Thrombinhemmung auf der Oberfläche der Thrombozytenmembran durch die üblichen Gerinnungstests zu erfassen, ist schwierig [300,301]. Auch die Durchführung von Studien zur Untersuchung von Nahrungsmittelleffekten sind schwierig [302].

Ein schwach wirksamer, aber mengenmäßig starker Extraktbestandteil zeigt die gleiche Hemmung wie ein stark wirksamer, aber mengenmäßig schwacher Extraktbestandteil. Die Erfahrung aus dieser Arbeit zeigt, dass ein Screening ohne umfangreiche Eliminations- oder Fraktionierungsschritte wahrscheinlicher zur Auswahl eines Extraktes mit einem schwach wirksamen Hauptbestandteil führt. Eine grundsätzlich andere Herangehensweise bildet die Abtrennung von Enzym-Inhibitor Komplexen aus der Matrix. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Abtrennung dieses Komplexes durch eine Fällung mit Gerbstoffen möglich ist. Eine Validierung der Methode erfolgte jedoch nicht. Allerdings war die Methode unter den gewählten Bedingungen geeignet zur Auffindung des Inhibitors in einer Matrix aus verschiedenen Arzneistoffen. Dabei war sie einfach und schnell durchzuführen, anspruchslos in Bezug auf die apparative Ausstattung sowie billig in den verwendeten Materialien.

Experimenteller Teil

1 Allgemeine Methoden und Materialien

1.1 Chromatographie

1.1.1 HPLC-Geräte

Analytische HPLC:

Pumpen:	Waters MSDS 600 E Waters MSDS 600 Waters LC Module I plus
Controller:	Waters 600 E Waters 600
Detektoren:	Photodiodenarraydetektor Waters 991 Photodiodenarraydetektor Waters 996
Injektionsventil:	Rheodyne 7125 (20 und 300 µl Dosierschleife)
Datenverarbeitung:	NEC Powermate 386/25 mit Waters 991 Software Plantron 386 DX-66 mit Waters 991 Software Rechner Noname mit Waters Millenium™ Chromatography Manager Version 2.15
Schreiber:	Graphikplotter Waters 5200

1.1.2 HPLC Bedingungen

Nr.	Stationäre Phase	Mobile Phase, Fluß, Detektion																					
1	Macherey-Nagel Nucleodur gravity RP 18, 250 x 4 mm, 5 µm	<p>A: Wasser / 0,5 % Ameisensäure; B: Methanol Einspritzvolumen: 20 µl Fluß: 1ml/min $\lambda = 280 \text{ nm}$</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>82</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>82</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>35</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>55</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit (min)	A	B	0	82	18	20	82	18	40	35	65	45	0	100	55	0	100			
Zeit (min)	A	B																					
0	82	18																					
20	82	18																					
40	35	65																					
45	0	100																					
55	0	100																					
2	Macherey-Nagel Nucleodur gravity RP 18, 250 x 4 mm, 5 µm	<p>A: Wasser / 1% Essigsäure; B: Methanol Einspritzvolumen: 20 µl Fluß: 1ml/min $\lambda = 280 \text{ nm}$</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>55</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>70</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit (min)	A	B	0	95	5	10	95	5	30	80	20	55	60	40	60	10	90	70	10	90
Zeit (min)	A	B																					
0	95	5																					
10	95	5																					
30	80	20																					
55	60	40																					
60	10	90																					
70	10	90																					

Nr.	Stationäre Phase	Mobile Phase, Fluß, Detektion																												
3	Macherey-Nagel Kieselgel Si 60, 15 – 25 µm in einer Edelstahlkartusche 250 x 100 mm, Probenzone ca. 1 cm; Trennbett ca. 24 cm	<p>A: Hexan; B: Diethylether; C: Methanol Fluß: 1 ml/min $\lambda = 270 \text{ nm}$</p> <table border="1" data-bbox="724 461 1361 875"> <thead> <tr> <th>Zeit (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> <th>C</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>100</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>350</td> <td></td> <td>100</td> <td></td> </tr> <tr> <td>400</td> <td></td> <td>100</td> <td></td> </tr> <tr> <td>700</td> <td></td> <td></td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>750</td> <td></td> <td></td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit (min)	A	B	C	0	100			50	100			350		100		400		100		700			100	750			100
Zeit (min)	A	B	C																											
0	100																													
50	100																													
350		100																												
400		100																												
700			100																											
750			100																											
4	Macherey-Nagel Nucleodur gravity RP 18, 250 x 4 mm, 5 µm	<p>A: Acetonitril; B: Wasser Einspritzvolumen: 20 µl Fluß: 1ml/min $\lambda = 205 \text{ nm}$; MS-EI (Fettsäuremethylester) $\lambda = 254 \text{ nm}$ (Fettsäurephenacylester)</p> <table border="1" data-bbox="724 1167 1361 1406"> <thead> <tr> <th>Zeit (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>100</td> <td></td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>100</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Zeit (min)	A	B	0	80	20	10	100		50	100																	
Zeit (min)	A	B																												
0	80	20																												
10	100																													
50	100																													
5	Macherey-Nagel Nucleodur gravity RP 18, 250 x 4 mm, 5 µm	<p>A: Acetonitril; B: Wasser Einspritzvolumen: 20 µl Fluß: 1ml/min $\lambda = 203 \text{ nm}$</p> <table border="1" data-bbox="724 1641 1361 1870"> <thead> <tr> <th>Zeit (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>100</td> <td></td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>100</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Zeit (min)	A	B	0	80	20	10	100		30	100																	
Zeit (min)	A	B																												
0	80	20																												
10	100																													
30	100																													

Nr.	Stationäre Phase	Mobile Phase, Fluß, Detektion															
6	Macherey-Nagel Nucleodur gravity RP 18, 250 x 4 mm, 5 µm	A: Acetonitril; B: Wasser Einspritzvolumen: 20 µl Fluß: 1ml/min $\lambda = 203 \text{ nm}$ <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>100</td> <td></td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>100</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Zeit (min)	A	B	0	95	5	5	95	5	10	100		30	100	
Zeit (min)	A	B															
0	95	5															
5	95	5															
10	100																
30	100																
7	Macherey-Nagel Nucleodur gravity RP 18, 250 x 4 mm, 5 µm	A: Acetonitril; B: Wasser / 0,05 % Trifluoressigsäure Einspritzvolumen: 20 µl Fluß: 1ml/min $\lambda = 220 \text{ nm}$ <table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Zeit (min)	A	B	0	5	95	10	5	95	50	100	0	60	100	0
Zeit (min)	A	B															
0	5	95															
10	5	95															
50	100	0															
60	100	0															

1.2 Lösungsmittel

Für die analytische HPLC wurden Lösungsmittel der Firmen J.T. Baker und Promochem mit gradient grade Qualität verwendet. Die bei der analytischen Extrographie eingesetzten Lösungsmittel hatten die Qualität „reinst“.

Wasser für die HPLC, sowie zur Herstellung der Pufferlösungen wurde über eine mit demineralisiertem Wasser gespeiste Reinstwasseranlage Seralpur Pro 90 C der Firma Seral mit Bakterien-Membranfilter Supor^(R) DCFTM CHS92DE 0,2 µm Porenweite (Fa. Gelman Sciences) gewonnen. Die Leitfähigkeit des Wassers lag bei Entnahme unter 2 uS/cm.

Das bei der Inhibitionstestung sowie bei der Fällung der Gerbstoffe mit verschiedenen Fällungsreagenzien verwendete Ethanol wurde durch Destillation von vergältem Ethanol gewonnen.

Alle weiteren Lösungsmittel besaßen p.A. Qualität.

1.3 Massenspektrometrische Bestimmungen

Die LC-EI-MS Messungen wurden mit einem Quadrupol-Particle-Beam-Massenspektrometer MD 800 der Firma Fisons durchgeführt, gekoppelt mit einem LC Module I Plus HPLC-Gerät (Waters) mit integriertem Autosampler. Es wurde eine Ionisierungsenergie von 70 eV verwendet. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software MassLab Version 1.3.

1.4 UV Spektrometer

Bei dem für die Bestimmung der Fällungsmaxima und für den Vergleich der Gerbstofffällungsreagenzien verwendete Spektrometer handelte es sich um das Modell Ultraspec 1000 der Firma Pharmacia Biotech.

1.5 NMR Spektroskopie

Die Aufnahme des Kernresonanzspektrums erfolgte mit dem Spektrometer JEOL^(R) Eclipse+ 500 (500 Mhz). Die Werte der chemischen Verschiebung sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die δ -Skala. Die Kalibrierung erfolgte auf das Lösungsmittelsignal. Die Bearbeitung des Spektrums erfolgte mit dem Programm Delta V 4.1 der Firma Jeol.

1.6 pH-Meter

Für die Bestimmung und Einstellung der pH Werte wurden die pH Meter Metrohm 632 und WTW pH 315i mit dazugehöriger Elektrode verwendet.

1.7 Zentrifugen

Für die Zentrifugation von Eppendorf Cups wurde die Zentrifuge Z230M der Firma Hermle Labortechnik GmbH (Wehingen) mit den Festwinkelrotoren 200-56 (9981 x g) und 220.59 V (13360 x g) verwendet.

Für die Zentrifugation von Zentrifugengläser wurde die Digifuge der Firma Heraeus, Langenselbold, verwendet.

1.8 Vakuumkonzentrator

Zur Vakuumkonzentrierung wurde ein Speed-Vac-Concentrator, Modell SVC 100 H, der Firma Bachofer, Reutlingen verwendet.

1.9 Ultraschallgeräte

Verwendet wurden die Ultraschallgeräte SonorexSuper RK 106 und Super RK 255H der Firma Bandelin, Berlin.

1.10 Drogen

Die bearbeiteten Drogen wurden von der Firma Caesar & Loretz GmbH (Hilden) bezogen.

1.11 Proteine

Thrombin:	Thrombin aus Rinderplasma, 50 NIH-U/mg, Firma Merck
Urease:	Urease aus Schwertbohnen, 5 NIH-U/mg, Firma Merck
Albumin:	Fraktion V aus Rinderserum, Firma Merck (verwendet für die Fällung mit den Proanthocyanidinen)
Albumin:	Albumin aus Rinderserum, Firma Fluka (verwendet für den Puffer bei der Inhibitionstestung)
β -Glucuronidase:	β -Glucuronidase aus <i>Helix aspersa</i> (EC 3.2.1.31), 470,7 NIH-U/mg, Firma Sigma
β -Glucosidase:	β -Glucosidase aus Mandeln (EC 3.2.1.21), 6,9 NIH-U/mg, Firma Sigma
Trypsin:	Trypsin aus Rinderpankreas (EC 3.4.21.4), 10,800 NIH-U/mg, Firma Sigma

1.12 Chemikalien, Material und Referenzsubstanzen

Chemikalien und Reagenzien:

Polyvinylpyrrolidon 40, Gelatine from porcine skin (Typ A), Trispuffer wurden von der Firma Sigma, Pefabloc SC, Chromozym TH wurden von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Polyclar AT wurde von der Firma Serva, Tannin Pulver (Gerbsäure) wurde von der Firma Riedel de Haen, Benzamid-HCl wurde von der Firma Merck, 18-Crown-6 wurde von der Firma Acros, Primulin wurde von der Firma Sigma Aldrich, 4-Bromophenacylbromid wurde von der Firma Alfa Aesar, BF₃-Methanol Kit wurde von der Firma Supelco und Vitamin B12 wurde von der Firma MP Biomedicals bezogen.

Kaffeesäure, Sennosid B, Chlorogensäure wurden von der Firma Roth, (+)-Catechin, Taxifolin wurden von der Firma Sigma, (-)-Epicatechin wurde von der Firma ICN Biomedicals, Arbutin, Gallussäure-monohydrat wurden von der Firma Fluka, Podophyllotoxin, Aesculetin, Zimtsäure wurden von der Firma Acros bezogen.

Amitriptylinhydrochlorid, Diphenhydraminhydrochlorid, Homatropinhydrobromid, Lidocainhydrochlorid, Metoclopramidhydrochlorid, Metoprololtartrat, Neostigminmetilsulfat, Orciprenalinsulfat und Warfarin-Natrium sind Arzneistoffe aus dem 5. Semester Praktikum der Universität Marburg. Die Arzneistoffe stammen aus diversen Firmenspenden.

Der Inhibitor des 4 Amidinophenylalanin Typs (K_i 0,42 µmol/l gegenüber Thrombin) wurde von Dr. Stürzebecher, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena, synthetisiert.

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.A. Qualität eingesetzt.

Referenzsubstanzen:

Eicosatriensäure, Erucasäure und Eicosensäure wurden von der Firma Sigma, Linolsäure, Linolensäure, Octansäure wurden von der Firma Acros, 9-Decensäure wurde von der Firma Fluorochem, Arachidonsäure, Palmitinsäure, Vaccensäure wurde von der Firma Fluka, Stearidonsäure wurde von der Firma Cayman, Eicosapentaensäure wurde von der Firma MP Biomedicals, Docosahexaensäure wurde von der Firma ICN Biomedicals, Elaidinsäure wurde von der Firma Alfa Aesar und Ölsäure wurde von der Firma Aldrich bezogen.

Material:

Das Sephadex LH 20 Material und Sephadex G 10 Material stammt von der Firma Pharmacia.

Die DC Kieselgelplatten ohne Fluoreszenzindikator, 20 x 20 cm, 0,25 mm, stammen von der Firma Merck.

2 Inhibition von Rinderthrombin

2.1 Plate Reader

Verwendet wurde der Plate Reader iEMS Reader MF von der Firma LabSystems mit 96er Microtiterplatten. Die Messung wurde mittels iEMS Accent Software aufgezeichnet und mittels Microsoft Excel 97 Software ausgewertet.

2.2 Durchführung

Für den Inhibitionstest wurde, bis auf die Enzymkonzentration, die Methode nach Stürzebecher verwendet [303].

Puffer: Es werden 608 mg Tris Puffer und 900 mg NaCl in 100 ml bidest. Wasser gelöst. Der pH wird anschließend mit HCl (2 mMol) auf 8,0 eingestellt (c Ansatz: 0,05 mol/l Tris/HCl, 0,154 mol/l NaCl). Der Inhibitor wird in Ethanol (5 % vom Gesamtvolumen) angelöst. Anschließend wird mit Puffer aufgefüllt.

Enzym: 1 mg/ml (= 50 NIH-U/ml) werden in 0,9 %iger NaCl Lösung gelöst (Stammlösung). Für den Ansatz wird 1:100 mit einer Lösung aus 0,9 % NaCl und 1 % Rinderserumalbumin verdünnt.

Substrat: 6,6 mg Chromozym TH werden in 10 ml bidest. Wasser gelöst (c = 1 mmol/l).

Meßansatz:

200	µl Puffer/Inhibitor
25	µl Substrat
50	µl Enzym

Bedingungen: Raumtemperatur
Messung bei 405 nm, alle 10 Sek., 60 Messungen, vor Beginn der Messung wird die Microtiterplatte bei 600 RPM geschüttelt

Durchführung: Puffer und Enzym werden zusammenpipettiert. 15 Min. wird inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe des Substrats gestartet.

Zur Berechnung der Inhibition wird die Steigung des linearen Anfangsteil der Inhibitorlösung mit der Steigung der Blindprobe verglichen. Dabei wurden meistens die ersten 1 – 5 Werte nicht verwendet, da es durch Luftblasen zu Beginn der Reaktion zu Störungen kam. Die Inhibition berechnet sich wie folgt:

$$\text{Inhibition} = 100 - \left(\frac{\text{Steigung}_{\text{Inhibitor}}}{\text{Steigung}_{\text{Blindwert}}} * 100 \right)$$

Die Korrelation zwischen Zeit und Absorption wurde mit der „KORREL“ Funktion von Excel für den gleichen Abschnitt berechnet.

3 Screening

3.1 Extraktion

Die Drogen wurden entweder gepulvert eingekauft oder mit einer Kaffeemühle pulverisiert. Je 1 g Droge wurden in ein Zentrifugenglas eingewogen. Anschließend wurden 10 ml Methanol, beziehungsweise 10 ml Dichlormethan hinzugegeben. Die Reagenzgläser wurden für 15 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurde 10 Min. bei 4500 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert oder pipettiert und in ein weiteres Reagenzglas überführt. Das Lösungsmittel wurde bis zur Trockne eingeengt.

Die Extrakte wurden in ein Eppendorfcup eingewogen und in Ethanol angelöst. Anschließend wurde Puffer dazugegeben, so daß die Konzentration 1 mg/ml betrug und das Volumen des Ethanols 5 % des Gesamtvolumens beträgt. Die Proben wurden für 10 Min. in ein Ultraschallbad gestellt und anschließend für 10 Min. bei 12000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde wie unter 2.2 beschrieben auf Thrombinhemmung getestet.

3.2 Thrombinhemmung durch Drogen; erste Testserie

Nr.	Droge	Methanol Extrakte		Dichlormethanextrakte	
		Hemmung (%)		Hemmung (%)	
1	Herba Ephedrae	88,8	+/- 0,7	21,9	+/- 0,2
2	Herba Epilobii angustifol.	59,9	+/- 10,1	32,4	+/- 10,3
3	Flores Calendulae sine Calycibus	20,1	+/- 5,5	12,4	+/- 0,2
4	Herba Pulmonariae	10,4	+/- 20,6	15,6	+/- 1,8
5	Herba Symphyti	16,5	+/- 7,8	18,0	+/- 2,4
6	Herba Adonidis vernalis	54,9	+/- 19,5	98,4	+/- 2,6
7	Fructus Juniperi	17,8	+/- 11,4	13,1	+/- 14,9
8	Fructus Cardamomi excortic.	77,5	+/- 13,5	67,3	+/- 4,0
9	Piper Cayennense	70,6	+/- 0,9	69,4	+/- 2,5
10	Piper nigrum	43,9	+/- 1,1	43,9	+/- 1,0
11	Rhizoma Curcumae longae	39,8	+/- 12,4	39,8	+/- 1,8
12	Rhizoma Zingiberis mundat.	1,1	+/- 8,9	1,1	+/- 7,5
13	Fructus Anisi	78,6	+/- 2,4	78,5	+/- 1,1
14	Fructus Foeniculi amari	77,7	+/- 8,0	68,0	+/- 1,4
15	Semen Erucae	75,4	+/- 0,9	75,1	+/- 1,2
16	Fructus Capsici	58,0	+/- 0,9	64,0	+/- 3,0
17	Bulbus Allii sativi	30,6	+/- 21,1	28,4	+/- 1,8
18	Semen Foenugraeci	40,8	+/- 0,6	28,8	+/- 28,5
19	Fucus vesiculosus	71,3	+/- 6,5	14,6	+/- 8,4
20	Radix Liquiritiae mundat.	78,1	+/- 2,1	29,8	+/- 32,7
21	Cortex Quercus	58,9	+/- 5,3	60,2	+/- 12,6
22	Semen Arecae	96,1	+/- 1,3	32,4	+/- 0,2
23	Radix Pyrethri	15,8	+/- 3,6	24,0	+/- 1,6
24	Rhizoma Tormentillae	83,0	+/- 4,0	21,4	+/- 0,8
25	Aloe capensis	23,2	+/- 6,8	entfällt	
26	Pericarpium Aurantii expulp.	36,9	+/- 34,2	61,6	+/- 22,7
27	Kamala vera	61,7	+/- 10,8	52,6	+/- 3,6

28	Cortex Cinnamomi chinens.	83,0	+/- 2,7	48,0	+/- 1,8
29	Fungus Laricis	57,2	+/- 2,9	61,0	+/- 1,0
30	Radix Althaeae mundat.	10,0	+/- 2,9	79,2	+/- 8,2
31	Glandulae Lupuli	4,0	+/- 3,5	40,9	+/- 2,2
32	Resina Scammoniae	13,3	+/- 2,9	21,7	+/- 21,3
33	Resina Jalapae e Tubere levi	entfällt		entfällt	
34	Bulbus scillae albae	9,2	+/- 1,7	31,8	+/- 2,4
35	Kamillenblüten	36,6	+/- 1,7	entfällt	
36	Herba Spiraeae ulmariae	69,7	+/- 1,7	33,9	+/- 5,5
37	Herba Anserinae	73,8	+/- 2,9	17,9	+/- 11,8
38	Herba Chenopodii	28,8	+/- 2,3	66,1	+/- 0,0
39	Herba Solidaginis	32,7	+/- 0,9	15,1	+/- 0,6
40	Arnikablüten	37,6	+/- 3,2	36,3	+/- 10,0
41	Flores Sambuci	19,2	+/- 3,2	77,5	+/- 10,0
42	Fructus Coriandri	62,0	+/- 2,3	78,1	+/- 0,6
43	Fructus Carvi	69,5	+/- 2,6	79,4	+/- 0,0
44	Lichen islandicus	80,8	+/- 1,2	47,3	+/- 1,8
45	Herba Convallariae majalis	47,4	+/- 5,5	41,1	+/- 8,8
46	Herba Meliloti	43,3	+/- 8,8	55,4	+/- 9,2
47	Herba Plantaginis lanceolatae	27,7	+/- 3,6	58,2	+/- 5,2
48	Herba Fumariae	58,9	+/- 1,8	42,8	+/- 1,1
49	Herba Equiseti	44,4	+/- 1,2	37,7	+/- 4,3
50	Herba Cynarae scolymi	74,3	+/- 3,6	41,8	+/- 20,9
51	Herba Chelidonii	33,6	+/- 13,9	57,2	+/- 11,2
52	Herba Ledi palustris	70,1	+/- 13,3	entfällt	
53	Herba Cardui Mariae	21,1	+/- 0,9	65,3	+/- 3,7
54	Herba Sarrhamni scoparii	32,4	+/- 24,8	23,3	+/- 5,2
55	Flores Tiliae	92,1	+/- 0,9	49,5	+/- 3,2
56	Herba Hydrocotylis asiaticae	35,6	+/- 0,9	95,1	+/- 3,4
57	Fructus Ceratoniae	7,3	+/- 11,2	entfällt	

58	Radix Cichorii cultivata	9,0	+/- 2,7	3,8	+/- 4,7
59	Herba Euphrasiae	33,2	+/- 2,7	83,0	+/- 4,7
60	Cortex Hamamelidis	69,4	+/- 1,2	25,9	+/- 0,0
61	Radix Ononidis	27,6	+/- 1,2	37,9	+/- 3,2
62	Lignum Tabebuia	25,2	+/- 1,0	61,1	+/- 0,8
63	Radix Levistici	13,4	+/- 1,4	77,0	+/- 2,8
64	Thea viridis perlata	35,4	+/- 1,2	11,8	+/- 5,1
65	Cortex Salicis	76,4	+/- 1,2	32,1	+/- 0,8
66	Semen Angelicae	32,7	+/- 5,9	21,2	+/- 5,1
67	Cortex Quebracho	36,0	+/- 0,4	13,4	+/- 1,7
68	Semen Cucurbitae	11,3	+/- 0,2	34,1	+/- 3,2
69	Fructus Sabalae serrulatae	75,3	+/- 5,5	86,0	+/- 8,8
70	Rhizoma Cimicifugae	18,2	+/- 10,6	6,6	+/- 39,7
71	Radix Saponariae albae	13,6	+/- 2,4	33,9	+/- 0,8
72	Rhizoma Rusci	-2,4	+/- 0,0	11,9	+/- 2,5
73	Semen Cannabis	63,0	+/- 0,4	7,9	+/- 3,6
74	Cortex Cinnamomi ceylanici	87,4	+/- 0,2	27,5	+/- 1,3
75	Lignum Guajaci	13,5	+/- 2,2	25,9	+/- 5,2
76	Semen Agni casti	14,3	+/- 11,2	10,7	+/- 0,4
77	Semen Apii graveolentis	28,6	+/- 10,3	12,3	+/- 1,1
78	Carrageen	entfällt		entfällt	

Die Tabelle zeigt den Mittelwert der Hemmung aus 2 Messungen. Der Wert nach +/- stellt die Standardabweichung dar. Bezogen wurden die Werte auf eine Blindprobe, die den Durchschnitt von 4 Einzelmessungen darstellt.

Die Angabe „entfällt“ wurde für Drogen verwendet, die mit dem verwendeten Extraktionsverfahren keine ausreichende Menge an Extrakt für einen Test lieferten.

Die Korrelation sämtlicher Messergebnisse war größer als 0,99 mit Ausnahme folgender Meßergebnisse: Methanol: Nr. 50, 48, 45, 46, 22, 20; Dichlormethan: Nr. 56, 53, 30, 6

Mundat. = mundatus, geschält; expulp. = expulpatus, von der Innenschicht befreit

3.3 Fällung der Gerbstoffe

Die Extrakte wurden zu 1 mg/ml wie unter 2.2 beschrieben gelöst. Polyvinylpyrrolidon 40 wurde unter den gleichen Bedingungen 2 %ig gelöst. 400 µl Extrakt und 200 µl PVP wurden gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation wurde 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wie unter 2.2 beschrieben getestet. Als Blindwert diente die entsprechende Menge PVP 40, die zu 400 µl Puffer (mit 5 % Ethanol) gegeben wurde.

3.4 Thrombinhemmung durch Drogen; zweite Testserie

Nr.	Droge	Extrakt	Zugabe von Wasser			Zugabe von PVP		
			Hemmung (%)			Hemmung (%)		
1	Rhizoma Tormentillae	MeOH	77,4	+/-	1,9	17,6	+/-	4,7
2	Semen Erucae	CH ₂ Cl ₂	75,9	+/-	8,5	49,1	+/-	7,4
3	Fructus Cardamomi	MeOH	79,6	+/-	2,7	75,4	+/-	0,2
4	Radix Liquiritiae	MeOH	13,0	+/-	0,8	16,4	+/-	4,4
5	Lichen Islandicus	MeOH	40,6	+/-	0,5	31,7	+/-	0,5
6	Herba Ephedrae	MeOH	81,5	+/-	0,5	4,2	+/-	0,0
7	Flores Sambuci	CH ₂ Cl ₂	55,7	+/-	2,2	56,1	+/-	0,5
8	Cortex Salicis	MeOH	59,9	+/-	1,1	21,4	+/-	3,2
9	Herba Adonidis	CH ₂ Cl ₂	63,6	+/-	0,3	68,1	+/-	0,7
10	Flores Tiliae	MeOH	79,4	+/-	0,8	9,1	+/-	0,0
11	Semen Arecae	MeOH	96,7	+/-	0,3	58,0	+/-	0,2
12	Fructus Sabalae	MeOH	77,6	+/-	1,1	80,0	+/-	0,2
13	Herba Euphrasiae	CH ₂ Cl ₂	18,8	+/-	1,4	24,6	+/-	1,2
14	Radix Levistici	CH ₂ Cl ₂	24,2	+/-	1,4	36,1	+/-	2,7
15	Radix Althaea	CH ₂ Cl ₂	63,2	+/-	1,9	70,9	+/-	0,2
16	Herba Hydrocotylis	CH ₂ Cl ₂	29,0	+/-	2,2	33,4	+/-	0,5
17	Semen Erucae	MeOH	72,5	+/-	0,0	73,6	+/-	0,6
18	Fructus Anisi	CH ₂ Cl ₂	81,7	+/-	3,1	83,2	+/-	4,5
19	Fructus Anisi	MeOH	85,4	+/-	0,0	85,7	+/-	0,3
20	Fructus Carvi	CH ₂ Cl ₂	87,9	+/-	1,9	86,6	+/-	1,6
21	Fructus Coriandri	CH ₂ Cl ₂	77,1	+/-	0,4	81,6	+/-	0,3

22	Fructus Foeniculi	MeOH	81,9	+/-	7,2	68,8	+/-	1,0
23	Fructus Sabalae	CH ₂ Cl ₂	79,8	+/-	2,7	80,4	+/-	0,6
	Cortex Cinnamomi							
24	chinens.	MeOH	77,3	+/-	0,0	14,6	+/-	1,6
	Cortex Cinnamomi							
25	ceylan.	MeOH	78,7	+/-	1,1	13,1	+/-	0,0

Die Hemmung stellt den Durchschnitt von 2 Messwerten dar. Der Wert nach +/- stellt die Standardabweichung dar. Bezogen wurden die Werte auf den Durchschnitt von 3 Messungen (Blindwert).

Sämtliche Messungen hatten eine Korrelation von 0,99 oder höher.

3.5 Größenausschlußchromatographie

Sephadex G 10 wurde für 2 Stunden in einer wäßrigen Lösung mit 0,15 M NaCl und 10 % Ethanol gequollen. Anschließend wurden damit PD 10 Säulen (55 x 15 mm, Pharmacia) gepackt. Die Extrakte wurden zu 1 mg/ml in Assaybedingungen gelöst. 200 µl der Probe wurden mit 50 µl Vitamin B12 (Konzentration = 0,1 %) und 50 µl p-Nitroanilin (Konzentration = 0,1 %) versetzt und auf die Säule aufgetragen. Als Fließmittel wurde 0,15 M NaCl mit 10 % Ethanol verwendet. Die durch Vitamin B12 rot markierte Fraktion wird gesammelt und bis zur Lösungsmittelfreiheit getrocknet. Nachdem die Vitamin B 12 Fraktion gesammelt wurde, wurde als Fließmittel 50 % Ethanol, 0,2 M NaCl, 2 % Essigsäure und 48 % Wasser verwendet und so lange gespült, bis die durch p-Nitroanilin gekennzeichnete Fraktion von der Säule eluiert war. Anschließend wurde wieder auf Anfangsbedingungen umgespült.

Die getrockneten Vitamin B12 Fraktionen wurden in 500 µl Assaypuffer (siehe 2.2) aufgenommen und vermessen. Als Blindwert wurde eine Probe verwendet, bei der 200 µl Puffer/Ethanol mit 50 µl Vit. B12 und 50 µl pNA aufgetragen und analog verfahren wurde. Zusätzlich wurde mit einer Probe mit 200 µl Benzamidin (1%) analog verfahren.

3.6 Thrombinhemmung durch Drogen; dritte Testserie

Nr.	Droge	Extrakt	Hemmung (%)		
1	Fructus Cardamomi	MeOH	-12,9	+/-	0,0
2	Flores Sambuci	CH ₂ Cl ₂	-14,2	+/-	3,0
3	Herba Adonidis	CH ₂ Cl ₂	-17,2	+/-	3,7
4	Fructus Sabalae	MeOH	-14,2	+/-	3,0
5	Radix Althaeae	CH ₂ Cl ₂	-16,8	+/-	1,8
6	Semen Erucae	MeOH	-11,2	+/-	1,2
7	Fructus Anisi	CH ₂ Cl ₂	-16,4	+/-	7,3
8	Fructus Anisi	MeOH	-22,8	+/-	9,1
9	Fructus Carvi	CH ₂ Cl ₂	-12,9	+/-	3,7
10	Fructus Coriandri	CH ₂ Cl ₂	-11,6	+/-	1,8
11	Fructus Foeniculi	MeOH	-9,9	+/-	4,3
12	Fructus Sabalae	CH ₂ Cl ₂	-6,9	+/-	6,1
	Benzamidin		-1,7	+/-	4,9

Die Hemmwerte stellen den Durchschnitt aus 2 Messungen dar einschließlich der Standardabweichung. Bezogen wurden die Werte auf den Durchschnitt von 2 Werten (Blindprobe). Die Korrelation sämtlicher Meßwerte war mindestens 0,999.

3.7 „Promiscuous“ Inhibitoren

1 mg Extrakt wurde wie unter 2.2 beschrieben gelöst und zusätzlich mit Tween 20 versetzt (Konzentration im Ansatz: 0,375 %). Die Vergleichsproben wurden ohne Tween 20 gelöst. Als Blindwerte wurden entsprechend der Puffer / 5% Ethanol mit und ohne Tween 20 vermessen.

3.8 Thrombinhemmung durch Drogen; vierte Testserie

Nr.	Droge	Extrakt	Vergleich			+ Tween 20		
			Hemmung (%)			Hemmung (%)		
1	Fructus Cardamomi	MeOH	73,6	+/-	5,8	39,1	+/-	1,4
2	Flores Sambuci	CH ₂ Cl ₂	48,4	+/-	9,5	30,0	+/-	2,7
3	Herba Adonidis	CH ₂ Cl ₂	68,8	+/-	4,4	64,7	+/-	0,3
4	Fructus Sabalae	MeOH	68,0	+/-	1,0	53,7	+/-	0,3
5	Radix Althaeae	CH ₂ Cl ₂	54,7	+/-	1,7	42,0	+/-	1,4
6	Semen Erucae	MeOH	60,5	+/-	0,0	46,8	+/-	3,4
7	Fructus Anisi	CH ₂ Cl ₂	70,0	+/-	1,7	50,8	+/-	3,7
8	Fructus Anisi	MeOH	69,4	+/-	0,0	56,8	+/-	1,4
9	Fructus Carvi	CH ₂ Cl ₂	73,4	+/-	1,4	52,3	+/-	0,3
10	Fructus Coriandri	CH ₂ Cl ₂	72,8	+/-	0,3	56,1	+/-	0,3
11	Fructus Foeniculi	MeOH	63,3	+/-	2,7	39,6	+/-	0,7
12	Fructus Sabalae	CH ₂ Cl ₂	68,8	+/-	1,7	52,8	+/-	0,3

Die Hemmwerte stellen den Durchschnitt aus 2 Messungen dar einschließlich der Standardabweichung (+/- Werte). Bezogen wurden die Werte auf den Durchschnitt von 4 Werten (Blindprobe). Die Korrelation sämtlicher Meßwerte war mindestens 0,99.

4 Vergleich von Fällungsmethoden

4.1 Gewinnung des kondensierten Gerbstoffes

Die kondensierten Gerbstoffe wurden aus Zimt gewonnen. Dazu wurde die unter 5.1 beschriebene Methode verwendet.

4.2 Einfluß der Konzentration

Die Fällungsreagenzien wurden in der Konzentration 2 % (m/V) in bidestilliertem Wasser gelöst. Gerbsäure und kondensierter Gerbstoff wurden in der Konzentration 1 % (m/V) in bidestilliertem Wasser gelöst. Zur Bestimmung des Ausmaßes der Fällung wurde die Methode nach Hagerman verwendet [228] mit der Variation, dass nicht der

gefällte Gerbstoff vermessen wurde, sondern der im Filtrat verbliebene Gerbstoff. Zur Herstellung der Eisen-III-chloridlösung wurden 0,01 M FeCl_3 in 0,01 M Salzsäure gelöst. Zur Herstellung der Natriumdodecylsulfatlösung (SDS) wurden 2,5 g SDS mit 12,5 ml Triethanolamin in 250 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

250 μl Gerbsäure wurden mit 0, 50, 100, 150, 200 und 250 μl des jeweiligen Fällungsreagenzes versetzt. Die Volumendifferenz wurde mit Wasser ausgeglichen. Die Mischung wurde geschüttelt und 15 Minuten inkubiert. Nach 15 Minuten wurde für 15 Minuten zentrifugiert. 50 μl der Filtrats wurden mit 750 μl der SDS/TEA Lösung und 200 μl der Eisen-III-chloridlösung versetzt, gemischt und für 15 Minuten stehen gelassen. Nach 15 Minuten wurde diese Lösung 1:1 mit Wasser verdünnt und die Absorption gegen den entsprechenden Blindwert bei 510 nm gemessen.

4.3 Einfluß des pH-Wertes

Die Lösungen unterschiedlichen pH Wertes wurden mit 0,01 M Na_3PO_4 und 0,01 M H_3PO_4 hergestellt. Die Gerbstoffe wurden in der Konzentration 1 % (m/V) in den Lösungen der pH Werte 4 – 10 gelöst. Die Fällungsreagenzien wurden in der Konzentration 2 % (m/V) in bidestilliertem Wasser gelöst. Die anderen Lösungen wurden, wie oben beschrieben, verwendet.

250 μl des Gerbstoffes wurden mit 50 μl Fällungsreagenz gemischt und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde für 15 Minuten zentrifugiert. 50 μl des Filtrats wurden mit 750 μl der SDS/TEA Lösung und 100 μl der Eisen-III-chloridlösung versetzt. Anschließend wurde für 15 Minuten inkubiert. Gerbsäure wurde anschließend 1:5 mit Wasser verdünnt, die kondensierten Gerbstoffe wurden unverdünnt bei 510 nm vermessen.

4.4 Einfluß des Lösungsmittels

Die Gerbstoffe wurden in der Konzentration 1 % (m/V) in den Lösungsmitteln Ethanol, Methanol und Dimethylsulfoxid in den Anteilen 0, 20, 40, 60, 80 und 100 % (m/V) gelöst. Die Fällungsreagenzien wurden in der Konzentration 2 % (m/V) in bidestilliertem Wasser gelöst. Alle übrigen Lösungen wurden, wie oben beschrieben, verwendet.

250 μl der Gerbstofflösung wurden mit 50 μl Fällungsreagenz versetzt, gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für 15 Minuten

zentrifugiert. 50 µl des Filtrats wurden mit 750 µl der SDS/TEA und 200 µl der Eisen-III-chloridlösung versetzt, gemischt und für 15 Minuten inkubiert. Gerbsäure wurde vor der Messung der Absorption 1:5, die kondensierten Gerbstoffe wurden vor der Vermessung 1:1 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Die Absorption wurde bei 510 nm vermessen.

4.5 Einfluß auf andere Phenole

Die Phenole Catechin, Epicatechin, Aesculetin, Podophyllotoxin, Arbutin, Kaffeesäure, Gallussäure, Zimtsäure, Chlorogensäure, Sennosid B und Taxifolin wurden in der Konzentration 5 µmol/ml in 20 % Methanol gelöst. Die Fällungsreagenzien wurden durch Lösen von 2 % (m/V) PVP, Coffein, Gelatine und Bleiacetat in bidestilliertem Wasser hergestellt. Sämtliche Phenole wurden zu gleichen Anteilen gemischt. 400 µl dieser Mischung wurden mit je 100 µl der Fällungsreagenzien versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert. Das Filtrat wurde chromatographisch vermessen (siehe 1.1.2. Methode 1).

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Fällung der Phenole wurde ein Blindwert mit Zugabe von Wasser, statt Zugabe von Fällungsreagenz, durchgeführt. Durch Vergleich der AUC der Chromatogramme mit diesem Blindwert, wurde das Ausmaß der Fällung bestimmt. Um die Empfindlichkeit zu erhöhen, wurden die unterschiedlichen Substanzen im Bereich ihrer maximalen UV Absorption verglichen. Jeder Wert wurde doppelt bestimmt.

	Retentionszeit (Min)	UV max
Catechin	11,77	230
Epicatechin	29,86	230
Aesculetin	18,16	345
Podophyllotoxin	46,1	240
Arbutin	2,91	285
Kaffeesäure	22,96	325
Gallussäure	4,21	270
Zimtsäure	44,7	275
Chlorogensäure	16,66	325
Senosid B	39,7	270
Taxifolin	35,96	290

4.6 Einfluß der Assaybedingungen auf die Fällung von Gerbstoffen

Die Gerbstofflösungen wurden in einer Konzentration von 1 % (m/V) in 10 % Ethanol-Thrombinassaypuffer gelöst. Die Fällungsreagenzien wurden in einer Konzentration von 2 % (m/V) in bidestilliertem Wasser gelöst. Alle anderen Lösungen wurden, wie oben beschrieben, verwendet. 250 µl der jeweiligen Gerbstofflösungen wurden mit 50 µl der Fällungsreagenzien versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation wird für 15 Minuten bei 13360 g zentrifugiert. 50 µl des Filtrats wurden mit 750 µl der SDS/TEA Lösung und 200 µl der Eisen-III-chloridlösung versetzt und gemischt. Nach 15 Minuten wird 1:1 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und die Absorption bei 510 nm gemessen.

4.7 Einfluß der Fällungsreagenzien auf die Aktivität von Thrombin

Die Fällungsreagenzien PVP, Gelatine und Coffein wurden in der Konzentration 2 % (m/V) durch Lösen in bidestilliertem Wasser hergestellt.

0, 20, 50 und 100 µl des Fällungsreagenzes wurden mit Thrombinpuffer gemischt, so daß das Volumen 200 µl beträgt. Anschließend wurden 50 µl der Enzymlösung hinzupipetiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität von Thrombin, wie unter 2.2 beschrieben, bestimmt. Durch Vergleich mit der

Aktivität des Thrombins nach der Zugabe von Wasser statt Fällungsreagenz wurde die Aktivität bestimmt.

5 Selektivität der Wechselwirkung

5.1 Gewinnung von Gerbstoffen

Zur Herstellung der Extrakte wurde die Methode der selektiven Extraktion verwendet [270]. 1,6 kg gepulverte Zimtrinde wurde in Hexan suspendiert und mit einem Ultraturrax zerkleinert. Mit dieser Suspension wurde eine Edelstahlkartusche der Ausmaße 100 x 400 mm befüllt. Nachdem die Säule befüllt war, wurde erschöpfend (< 10 mg Extrakt/100 ml Lösungsmittel) in der Reihenfolge Hexan, Dichlormethan, Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden zu Trockne eingeengt. Die Ausbeute war für Hexan 4,5 g, Dichlormethan 27,1 g und für Methanol 160,6 g. Der Methanolextrakt wurde für die weitere Bearbeitung verwendet.

Zur Gewinnung der Gerbstoffe aus Zimtrinde wurde die Methode nach Gu [259] verwendet. Sephadex LH 20 wurde 3 Stunden in 20 % Methanol gequollen. Anschließend wurde eine Glassäule mit nachregelbarem Säulenkopf der Ausmaße 15 x 450 mm damit befüllt. Die Säule wurde mit dem Fluß 1 ml/Min betrieben. Zur Fraktionierung wurde 1 g des Methanolextraktes aus Zimtrinde in 5 ml 20%igen Methanol gelöst und direkt auf die Säule eingespritzt. Dieser Extrakt wurde mit 120 ml 20%igen Methanol, 300 ml 60%igen Methanol, 400 ml 100%igen Methanol und 500 ml 70%igen Aceton eluiert. Anschließend wurde mit 120 ml 20%igen Methanol auf Ausgangsbedingungen umkonditioniert. Der Methanolextrakt wurde in 4 Fraktionen zu 100 ml gesammelt. Sämtliche Fraktionen wurden zur Lösungsmittelfreiheit getrocknet. Der Acetonextrakt wurde für die weiteren Experimente verwendet.

Zur Testung auf Hemmung von Thrombin wurden die getrockneten Fraktionen in der Konzentration 0,3 mg/ml wie unter 2.2 beschrieben, vermessen.

5.2 Bestimmung der Fällungsmaxima

Zur Bestimmung des Fällungsmaximums wurde die Methode nach Hagerman [227] in für kleinere Mengen angepassten Variante verwendet [228]. Mit 0,01 M Na_3PO_4 und 0,01 M H_3PO_4 wurden Puffer im Bereich von pH 2 – 12 hergestellt. Zur Herstellung der

Eisen-III-chloridlösung wurden 0,01 M FeCl_3 in 0,01 M Salzsäure gelöst. Zur Herstellung der Natriumdodecylsulfatlösung (SDS) wurden 2,5 g SDS mit 12,5 ml Triethanolamin in 250 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Sämtliche Enzyme wurden bei jedem pH Wert in der Konzentration 0,5 g/ml gelöst. Der Gerbstoffextrakt wird in der Konzentration 0,5 mg/ml in Methanol gelöst. 300 μl der Proteinlösung wird mit 100 μl der Gerbstofflösung versetzt. Nach 15 Min. Inkubationszeit wird für 5 Min. zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der Rückstand wurde mit 800 μl der SDS/TEA Lösung aufgenommen. Anschließend wurde 200 μl der Eisen-III-chloridlösung hinzupipettiert. Nach 15 Min. wurde die Absorption bei 510 nm gemessen. Jeder Wert wurde 3 Mal gemessen und der Durchschnitt bestimmt.

5.3 Säurekatalysierter Abbau

Von den verschiedenen Enzymen wurden Lösungen in der Konzentration 1 mg/ml in ihrem jeweiligen optimalen pH Fällungsbereich hergestellt. Zur Einstellung der pH Werte wurden 0,01 M Na_3PO_4 und 0,01 M H_3PO_4 verwendet. Die Gerbstofflösungen wurden in der Konzentration 5 mg/ml in 100 % Methanol hergestellt. Für den Abbau der Gerbstoffe wird die Methode nach Kennedy [109] verwendet. Dazu wurde eine Lösung aus 0,1 M Salzsäure, welche 50 g/L Phloroglucinol und 10 g/L Ascorbinsäure enthielt, hergestellt. Zur Beendigung der Reaktion wurde wäßrige Natriumacetatlösung ($c = 40 \text{ mM}$) im Überschuß hinzugegeben.

100 μl der Proteinlösung wurden mit 100 μl Gerbstofflösung und 200 μl Puffer des jeweiligen pH Wertes versetzt. Nach 10 Min. Inkubationszeit wurde zentrifugiert. Der Rückstand wurde mit 200 μl der Phloroglucinollösung versetzt, aufgeschüttelt und 20 Min. bei 50° C stehen gelassen. Nach 20 Min. wird 1000 μl der Natriumacetatlösung hinzupipettiert. 20 μl dieser Lösung wurden dann chromatographisch analysiert (siehe 1.1.2. Methode 2).

Für die Integration der Peaks wurde die Waters 991 Software im automatischen Integrationsmodus verwendet. Die AUC wurde für die 4 Hauptpeaks bestimmt. Jeder Wert wurde 3 Mal bestimmt. Zur Bestimmung der Verhältnisse der Peaks zueinander wurden die AUCs der Peaks 1 –3 durch die AUC des Peaks 4 geteilt.

5.4 Cochran Test und einfaktorielle Varianzanalyse

Messergebnisse:

AUC der Peaks:

	BSA	Thrombin	Trypsin	Urease	Beta- Glucuronidase	Beta- Glucosidase	Gerbstoff Zimt (GZ)
Peak 1	0,016851	0,003006	0,006187	0,010514	0,016424	0,029687	0,191459
	0,016730	0,003401	0,007230	0,010388	0,016413	0,029432	0,171012
	0,016732	0,004076	0,007506	0,010450	0,016303	0,029508	0,172658
Durchschnitt	0,016771	0,003494	0,006974	0,010451	0,016380	0,029542	0,178376
Standardabw.	0,000069	0,000541	0,000696	0,000063	0,000067	0,000131	0,011360
Peak 2	0,001713	0,000438	0,000874	0,001281	0,002390	0,002210	0,058041
	0,001235	0,000766	0,000672	0,001689	0,001719	0,002299	0,057562
	0,001321	0,000767	0,000295	0,001486	0,001387	0,002379	0,056957
Durchschnitt	0,001423	0,000657	0,000614	0,001485	0,001832	0,002296	0,057520
Standardabw.	0,000255	0,000190	0,000294	0,000204	0,000511	0,000085	0,000543
Peak 3	0,002563	0,000465	0,001049	0,001670	0,002424	0,004584	0,019161
	0,002501	0,000592	0,001257	0,001580	0,002428	0,004405	0,020399
	0,002462	0,000509	0,001326	0,001624	0,002439	0,004528	0,019254
Durchschnitt	0,002509	0,000522	0,001211	0,001625	0,002430	0,004506	0,019605
Standardabw.	0,000051	0,000064	0,000144	0,000045	0,000008	0,000092	0,000689
Peak 4	0,001724	0,000292	0,000610	0,001320	0,001936	0,003115	0,027717
	0,001674	0,000381	0,000573	0,001251	0,001660	0,003203	0,026563
	0,001656	0,000434	0,000520	0,001285	0,001799	0,003151	0,026390
Durchschnitt	0,001685	0,000369	0,000568	0,001285	0,001798	0,003156	0,026890
Standardabw.	0,000035	0,000072	0,000045	0,000035	0,000138	0,000044	0,000721

Daraus folgend die Berechnung der Peaks zueinander:

$$\text{AUC Peak X} / \text{AUC Peak 4} \quad \text{X} = \text{Peak 1,2,3}$$

Peak 4 ist demnach 1

	BSA	Thrombin	Trypsin	Urease	Beta- Glucuronidase	Beta- Glucosidase	GZ
Peak 1	10,003	8,146	10,899	8,180	9,133	9,406	7,120
	9,931	9,217	12,736	8,082	9,127	9,325	6,360
	9,932	11,046	13,223	8,130	9,066	9,349	6,421
Peak 2	1,017	1,187	1,540	0,997	1,329	0,700	2,158
	0,733	2,076	1,184	1,314	0,956	0,728	2,141
	0,784	2,079	0,520	1,156	0,771	0,754	2,118
Peak 3	1,521	1,260	1,848	1,299	1,348	1,452	0,713
	1,485	1,604	2,214	1,229	1,350	1,396	0,759
	1,461	1,379	2,336	1,263	1,356	1,435	0,716

Cochran-Test:

C krit. für k = 6, n = 3 – 1 : 0,6161; für k = 7, n = 3 – 1 : 0,5612

Varianzen	Peak 1	Peak 1 mit GZ	Peak 2	Peak 2 mit GZ	Peak 3	Peak 3 mit GZ
höchste Varianz	5,4895E-07	1,4595E-04	4,2115E-07	1,5993E-06	3,5884E-08	1,9906E-06
	3,7556E-07	5,4895E-07	1,1500E-07	4,2115E-07	2,1249E-08	3,5884E-08
	4,1989E-08	3,7556E-07	8,4120E-08	1,1500E-07	1,8563E-08	2,1249E-08
	3,0682E-08	4,1989E-08	6,8339E-08	8,4120E-08	1,8444E-08	1,8563E-08
	1,0925E-08	3,0682E-08	5,6883E-08	6,8339E-08	7,4248E-09	1,8444E-08
	9,5070E-09	1,0925E-08	1,6585E-08	5,6883E-08	6,3210E-09	7,4248E-09
niedrigste Varianz		9,5070E-09		1,6585E-08		6,3210E-09
G max	0,5395	0,9931	0,5526	0,6773	0,3326	0,9486
C krit	0,6161	0,5612	0,6161	0,5612	0,6161	0,5612

Freiheitsgrade: k = 6; n = 3 – 1; bzw. k = 7; n = 3 – 1 (mit GZ Reihe)

Einfache Varianzanalyse:

	Prüfgröße (F)	kritischer F-Wert
Peak 1	9,57	3,11
Peak 1 mit GZ	16,31	2,85
Peak 2	3,68	3,11
Peak 2 mit GZ	8,46	2,85
Peak 3	17,98	3,11
Peak 3 mit GZ	36,05	2,85

6 Die Fettsäuren in Herba Adonidis, Flores Sambuci, Semen Erucae und ihre Hemmung von Thrombin

6.1 Selektive Extraktion und analytische Extrographie von Herba Adonidis

Extraktion:

2,1 kg der Droge Herba Adonidis conc. wurden in Hexan suspendiert und mit Hilfe eines Ultraturrax (Fa. Janke und Kunkel KG, Typ T45, 10000 U/min) unter Eiskühlung des Ansatzes weiter zerkleinert. Das so erhaltene Homogenisat wurde in zwei miteinander verbundene Edelstahlkartuschen (Prepbar^(R) von Merck, 400 x 100 mm), die beidseitig mit Stahlfritten (Rückhaltevermögen 2 µm) verschlossenen waren, gefüllt. Die Droge wurde nacheinander mit den Lösungsmitteln Hexan, Dichlormethan und Methanol unter Verwendung einer HPLC Pumpe extrahiert. Mit den Lösungsmitteln Hexan und Dichlormethan wurde erschöpfend extrahiert. Die Extrakte wurden bis zur Lösungsmittelfreiheit getrocknet. Die Menge an gewonnenem Hexan Extrakt betrug 51,4 g, die des Dichlormethanextraktes 37,5 g.

Die anschließende Bestimmung der Thrombinhemmung zeigte, daß der Hexanextrakt am wirksamsten war (Konzentration des jeweiligen Extraktes 0,5 mg/ml).

Analytische Extrographie:

179 mg des selektiven Hexanextraktes wurden in ca. 30 ml Hexan gelöst und mit 913 mg Kieselgel (Merck Si60, 0,063 – 0,200 mm) versetzt. Mittels Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel unter Drehen des Kolbens entfernt und so der Extrakt auf das Lösungsmittel aufgezogen. Diese Mischung wurde in eine Edelstahlkartusche (250 x 10 mm) überführt. Es schloß sich ein Trennbett aus reinem Kieselgel (Macherey Nagel, Si60, 15 – 25 µm) an. Das reine Kieselgel wurde schichtweise durch Anpressen mit einem geeigneten Stampfwerkzeug verdichtet.

Die Chromatographie wurde wie beschrieben durchgeführt (siehe 1.1.2. Methode 3).

Die erhaltenen Fraktionen wurden bis zur Lösungsmittelfreiheit getrocknet und in der Konzentration 0,5 mg/ml getestet.

Testergebnis:

Unterfraktion	Minute	Ausbeute (mg)	Hemmung (%)	+/-	0,7
1	0 - 90	14,1	30,8	+/-	0,7
2	90 -105	17,4	4,1	+/-	1,4
3	105 - 150	8,9	7,5	+/-	0,7
4	150 - 255	77,2	85,0	+/-	0,7
5	255 - 345	11,6	55,0	+/-	0,7
6	345 - 420	7,0	45,8	+/-	4,1
7	420 - 750	38,2	29,3	+/-	0,0

Jedes Testergebnis stellt den Mittelwert aus 2 Meßwerten dar. Die +/- Spalte stellt die relative Standardabweichung dar.

6.2 Extraktion

Die Drogen wurden pulverisiert und mit der Methode nach Hara [272] extrahiert. 100 g der Droge wurden mit 1,8 l Hexan/Isopropanol (3:2) für eine Minute mazeriert. Das Mazerat wird filtriert und mit 0,2 l des gleichen Lösungsmittels nachgewaschen. Der so gewonnene Extrakt wurde bis zur Lösungsmittelfreiheit getrocknet.

6.3 Gewinnung der Fettsäuren durch präparative DC

100 mg des Extrakts wurden auf Kieselgel DC Platten (DC-Fertigplatten, Si 60 auf Glas, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm) unter Kammersättigung mit dem Fließmittel

Hexan/Diethylether/Essigsäure (60:40:1) eluiert. Die Spots ($R_f = 0,65$) wurden mit Primulin Spray (5 mg Primulin in Aceton/Wasser 8:2) besprüht, bei 366 nm unter der UV Lampe markiert, ausgekratzt und 3 Mal mit 20 ml Chloroform gewaschen. Der Chloroformextrakt wird bis zur Lösungsmittelfreiheit getrocknet. Dieser Extrakt wird für die weiteren Analysen verwendet.

6.4 Herstellung der Fettsäuremethylester

Die Methylester wurden nach der Methode von Morrison [273] hergestellt. 1 ml einer Lösung aus 10 % Bortrifluorid in Methanol wurde zu 1 mg der Fettsäurefraktion hinzugegeben. Die Mischung wurde in druck- und hitzestabilen Glasgefäßen für 5 Minuten in kochenden Wasser gegeben. Nach dem Abkühlen wurden 2 ml Pentan und 1 ml Wasser hinzugegeben. Die Mischung wurde zentrifugiert und die Pentanphase wurde gesammelt. Der Pentanextrakt wurde bis zur Lösungsmittelfreiheit getrocknet und vor der chromatographischen Analyse in 300 µl Hexan gelöst (Chromatographie: siehe 1.1.2. Methode 4).

6.5 Herstellung der p-Bromphenacylbromide

Für die Herstellung der p-Bromphenacylbromid wurde die Methode von Püttmann [304] verwendet. Eine Ausnahme bilden die Reaktionsbedingungen, die von Borch [305] stammen. Das Chromophor bildende Reagenz wurde durch Mischung von p-Bromphenacylbromid (50 mmol/l) und 18-Krone-6 Ether (5 mmol/l) in Acetonitril hergestellt. Zu 1 mg der Fettsäurefraktion wurden 500 µl Acetonitril, 6 µl des Chromophor bildenden Reagenzes und ca. 1 mg Kaliumhydrogencarbonat gegeben. Als Reaktionsgefäße wurden Eppendorfcups verwendet. Die Lösung standen über Nacht bei Raumtemperatur. Die Gefäße wurden zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß transferiert. Vor der chromatographischen Analyse wurden 200 µl Acetonitril hinzugegeben (Chromatographie: siehe 1.1.2. Methode 4).

6.6 Reextraktion der Fettsäuren aus wässrigem Medium

2 mg der Fettsäurefraktion wurden in 1 ml des Thrombin Assay Puffers, welcher 5 % Ethanol enthielt, gelöst. Die Mischung wurde zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Für die Reextraktion der Fettsäuren aus dem Thrombin Assay Puffer wurde die Methode nach Dole [306] verwendet. Dazu wurde zu 1 ml der

Pufferlösung 5 ml des Dole Reagenzes (Isopropanol/Heptan/1 M Schwefelsäure 40:10:1), 3 ml Heptan und 2 ml Wasser hinzugeben. Nach Mischung und Zentrifugation wurde die obere Phase gesammelt und bis zur Lösungsmittelfreiheit getrocknet. Anschließend wurden die p-Bromphenacylbromid wie oben beschrieben hergestellt.

6.7 Hemmung von Thrombin durch die Fettsäuren (I)

Die verschiedenen Fettsäuren wurden mit Ethanol angelöst und mit Thrombinpuffer aufgefüllt, so daß 5 % Ethanol im Ansatz war. Die Konzentration betrug 0,5 µmol/ml. Anschließend wurde Thrombin dazu gegeben und nach 15 Minuten Inkubation die Reaktion durch Zugabe von Chromozym TH gestartet.

Die Konzentration 0,1 µmol/ml wurde durch Verdünnung der 0,5 µmol/ml Lösung hergestellt.

Die Mischungen der Fettsäuren wurden durch anteilige Mischung der 0,5 µmol/ml Lösungen hergestellt.

Jeder Messwert stellt den Durchschnitt aus 3 Messungen dar.

6.8 Retentionszeiten und Massenspektren der Fettsäuren

Die chromatographischen Methoden sind unter 1.1 Methode 4 beschrieben. Die Fragmentierungsmuster und Retentionszeiten wurden mit denen von Referenzsubstanzen verglichen.

Die Werte in Klammern geben den prozentualen Anteil des Signals im Verhältnis zum Signal mit der höchsten Intensität an (% vom BPI = Base Peak Ion).

Herba Adonidis:

Linolensäuremethylester: t_R 15.63 min; LC/MS (70 eV): 292 [M+] (14), 261 (8), 236 (9), 173 (14), 149 (27), 135 (14), 121 (32), 108 (59), 95 (79), 79 (100), 67 (83), 55 (30)

Linolsäuremethylester: t_R 18.01 min; LC/MS (70 eV): 294 [M+] (12), 263 (14), 178 (6), 164 (13), 150 (18), 136 (11), 123 (10), 109 (36), 95 (93), 81 (62), 67 (100), 55 (33)

Palmitinsäuremethylester: t_R 22.11 min; LC/MS (70 eV): 270 [M+] (31), 239 (14), 227 (45), 213 (6), 199 (18), 185 (22), 171 (23), 157 (10), 143 (45), 129 (12), 115 (5), 101 (15), 87 (96), 74 (100), 55 (21)

Flores Sambuci:

Linolensäuremethylester: t_R 15.74 min; LC/MS (70 eV): 292 [M+] (3), 261 (6), 236 (5), 173 (12), 149 (22), 135 (14), 121 (38), 108 (85), 95 (72), 79 (100), 67 (96), 55 (26)

Linolsäuremethylester: t_R 18.15 min; LC/MS (70 eV): 294 [M+] (7), 263 (8), 178 (4), 164 (5), 150 (8), 136 (8), 123 (8), 109 (45), 95 (80), 81 (57), 67 (100), 55 (23)

Palmitinsäuremethylester: t_R 22.22 min; LC/MS (70 eV): 270 [M+] (10), 239 (13), 227 (7), 213 (5), 199 (16), 185 (20), 171 (16), 157 (6), 143 (29), 129 (10), 115 (5), 101 (12), 87 (87), 74 (100), 55 (20)

Semen Erucae:

Linolensäuremethylester: t_R 15.78 min; LC/MS (70 eV): 292 [M+] (4), 261 (3), 236 (5), 173 (6), 149 (17), 135 (20), 121 (35), 108 (55), 95 (66), 79 (100), 67 (93), 55 (25)

Linolsäuremethylester: t_R 18.18 min; LC/MS (70 eV): 294 [M+] (7), 263 (14), 178 (5), 164 (8), 150 (9), 136 (7), 123 (9), 109 (34), 95 (73), 81 (60), 67 (100), 55 (25)

Ölsäuremethylester: t_R 22.09 min; LC/MS (70 eV): 296 [M+] (4), 264 (79), 235 (6), 222 (18), 180 (16), 166 (10), 152 (12), 123 (18), 110 (51), 97 (77), 83 (58), 74 (71), 69 (100), 55 (72)

11-Eicosensäuremethylester: t_R 28.57 min; LC/MS (70 eV): 324 [M+] (3), 292 (72), 274 (4), 263 (14), 250 (19), 235 (11), 208 (15), 194 (7), 180 (6), 166 (9), 152 (14), 123 (18), 111 (40), 97 (93), 83 (57), 74 (52), 69 (100), 55 (71)

Erucasäuremethylester: t_R 38.69 min; LC/MS (70 eV): 352 [M+] (3), 320 (70), 278 (18), 249 (13), 236 (15), 222 (8), 194 (5), 180 (6), 152 (11), 138 (10), 123 (13), 96 (51), 83 (49), 74 (52), 69 (100), 55 (56)

7 Hemmung von Thrombin durch Fettsäuren

7.1 Hemmung von Thrombin durch die Fettsäuren (II)

Die verschiedenen Fettsäuren wurden mit Ethanol angelöst und mit Thrombinpuffer aufgefüllt, so daß 5 % Ethanol im Ansatz war. Die Konzentration betrug 0,5 µmol/ml. Anschließend wurde Thrombin dazu gegeben und nach 15 Minuten Inkubation die Reaktion durch Zugabe von Chromozym TH gestartet.

Die Ergebnisse wurden 3 fach bestimmt und auf den Durchschnitt von 4 Blindwerten bezogen. Dies wurde an 3 verschiedenen Tagen wiederholt. Die Ergebnisse repräsentierten den Durchschnitt von 9 Messwerten.

7.2 Inhibition von Thrombin durch Ölsäure in Gegenwart von β -Glucosidase

Zu dem Ansatz bestehend aus 200 µl in Ethanol/Puffer gelöster Ölsäure ($c = 0,5$ µmol/ml) wurden 50 µl einer 1 %igen, bzw. 2 %igen Beta Glucosidase Lösung gegeben, sowie 50 µl Thrombin in der normalen Konzentration. Nach 15 Minuten Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet.

Die Ergebnisse wurden 3 fach bestimmt und auf die jeweiligen Blindwerte ohne Inhibitor bezogen.

7.3 Reversible oder irreversible Inhibition ?

Zu 200 µl Ölsäure ($c = 0,5$ µmol/ml) in mehreren Vials einer Microtiterplatte wurde alle 15 Sekunden 50 µl Enzym dazugegeben. Nach der Zugabe des Enzyms zu den letzten Proben wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl Substrat gestartet. Nach 75 Sekunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 25 %iger Essigsäure gestoppt. Anschließend wurde die Absorption einfach gemessen.

Als Vergleich dienten der irreversible Inhibitor Pefabloc SC ($c = 2$ µmol/ml) und der reversible Inhibitor Benzamidin ($c = 5$ µmol/ml). Mit beiden Inhibitoren wurde analog verfahren.

Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 2 Messwerten dar.

7.4 Zeitabhängigkeit der Hemmung

Ölsäure wird in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{mol/ml}$ in Thrombinpuffer mit 5 % Ethanol gelöst. Die Ölsäure wird zusammen mit dem Enzym inkubiert. Nach 15 Minuten Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von Substrat gestartet. Der Blindwert wird analog ohne Ölsäure im Thrombinpuffer bestimmt.

7.5 Einfluß der Inkubationszeit

Ölsäure in der Konzentration 0,5 $\mu\text{mol/ml}$ in Thrombinpuffer (mit 5 % Ethanol), wird für 15, 10, 7, 4, 2, 1 und 0 Minuten mit Thrombin inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von Substrat gestartet.

7.6 Einfluß der Inhibitorkonzentration auf die Hemmung

Ölsäure in den Konzentrationen 0,5 und 1 $\mu\text{mol/ml}$ wird für 15 Minuten mit Thrombin inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von Substrat gestartet.

7.7 Einfluß der Änderung der Testbedingungen

Ölsäure in der Konzentration 0,5 $\mu\text{mol/ml}$ wird für 30 Sekunden mit Substrat inkubiert. Die Zugabe wird durch Zugabe von Thrombin gestartet.

7.8 Geht Ölsäure in die Bindetasche ?

8 mg Rinderthrombin wurde in 1 ml isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Ölsäure wurde zu 0,375 mg/ml in Thrombinpuffer mit 10 Ethanol gelöst. Der Inhibitor vom 4-Amidinophenylalanin Typ wurde in der Konzentration 1mg/ml in Thrombinpuffer gelöst. Die Gerbstofflösung wurde 2%-ig (m/V) in Thrombinpuffer gelöst.

Variante 1:

Zwei Ansätze zu je 300 μl der Thrombinlösung wurden mit 200 μl der Ölsäurelösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zu einem Ansatz 100 μl der Inhibitorlösung hinzupipettiert, während zu dem anderen Ansatz 100 μl Thrombinpuffer hinzupipettiert wurde. Nach 3 Minuten Inkubationszeit wurde durch Zugabe von 100 μl Gerbstofflösung gefällt. Nach 1 Minute wurde der Niederschlag abzentrifugiert und der Überstand chromatographisch vermessen (Chromatographie: siehe 1.1.2. Methode 5; t_R Ölsäure [Min]: 17,87).

Variante 2:

Zwei Ansätze zu je 400 µl der Thrombinlösung wurden mit 200 µl der Ölsäurelösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zu einem Ansatz 100 µl der Inhibitorlösung hinzupipettiert, während zu dem anderen Ansatz 100 µl Puffer hinzupipettiert wurde. Nach 3 Minuten Inkubationszeit wurde die Lösung chromatographisch vermessen (Chromatographie: siehe 1.1.2. Methode 6; t_R Ölsäure [Min]: 21,85).

8 Durchführung des Gerbstofffällungsassay

Die Arzneistoffe und der Inhibitor wurden in der Konzentration 2 µmol/ml in einer 0,9 %igen Natriumchloridlösung mit 10 % Ethanol gelöst. Anschließend wurden die Lösungen zu gleichen Anteilen gemischt, so daß eine Lösung erhalten wurde, in der jede Substanz in der Konzentration 0,2 µmol/ml vorlag.

Rinderthrombin (50 i.E.) wurde in einer Konzentration von 12,5 mg/ml in 0,9 %iger Natriumchloridlösung gelöst.

Tannin wurde in der Konzentration 10 mg/ml in 0,9 %iger Natriumchloridlösung gelöst. Das Freisetzungsreagenz besteht aus Methanol, Wasser, Trifluoressigsäure im Verhältnis 49,5 : 49,5 : 1.

Die Waschlösung besteht aus 10 % Ethanol in einer 0,9 % igen Kochsalzlösung.

100 µl des Substanzgemisches werden mit 300 µl der Enzymlösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird 100 µl der Gerbstofflösung hinzupipettiert. Nach einer Minute wird die Lösung bei 13360 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Zu dem Rückstand werden 200 µl der Waschlösung hinzugegeben. Der Rückstand wird aufgeschüttelt und anschließend wird erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Die Überstände der Waschschrte werden verworfen. Nach dem Waschvorgang, wird dem Rückstand 300 µl des Freisetzungsreagenzes hinzugegeben und eine Spatelspitze Polyclar AT® (ca. 10 mg). Die Mischung wird geschüttelt und anschließend für 5 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Anschließend wird erneut zentrifugiert. Das Filtrat wird anschließend chromatographisch vermessen (Chromatographie: siehe 1.1.2. Methode 7).

Anhang A

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Beiträge hervorgegangen:

Poster:

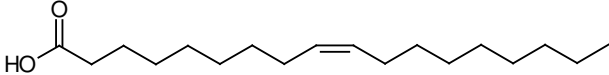
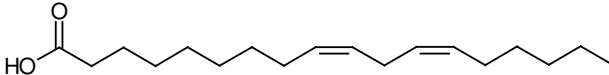
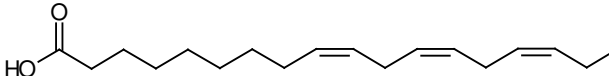
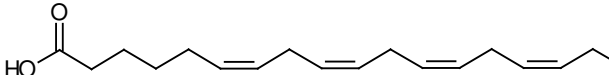
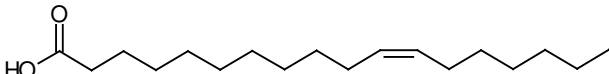
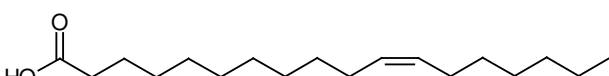
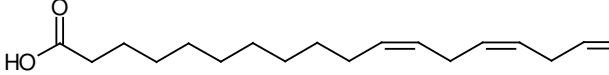
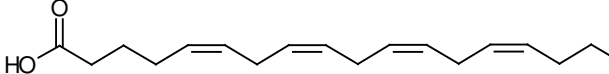
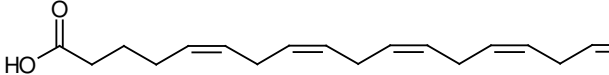
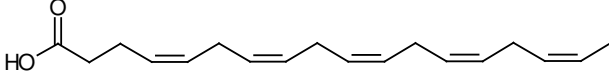
Rack, C., Matusch, R. (2004) Evaluation of Different Strategies for the Removal of Tannins in the Screening for Lead Structures, DPhG Jahrestagung, Regensburg

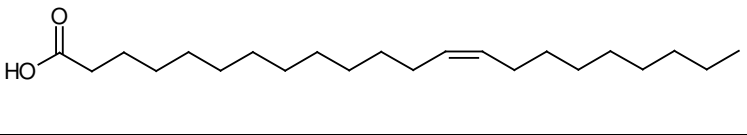
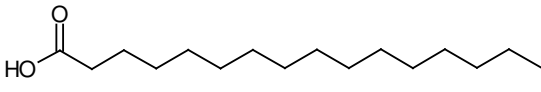
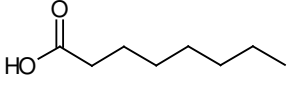
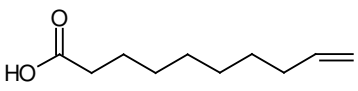
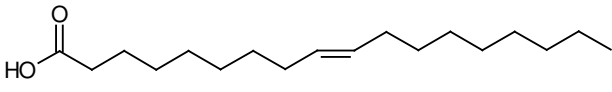
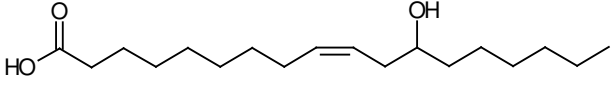
Rack, C. (2005) A New Approach for Finding the Active Substance in a Matrix Using a Tannin Precipitation Assay, DPhG Jahrestagung, Mainz

Anhang B

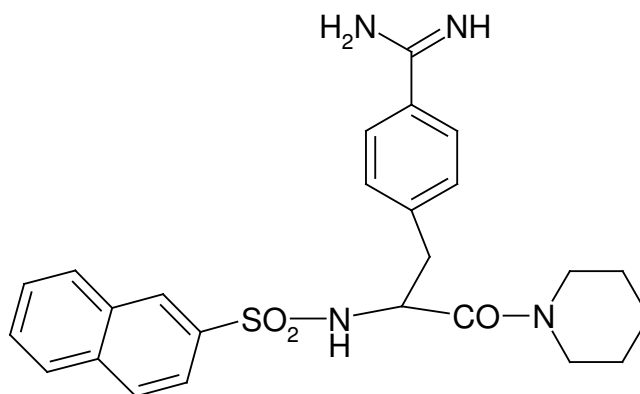
Strukturformeln der verwendeten Substanzen

Fettsäuren:

Ölsäure 18:1 9-cis-Octadecensäure	
Linolsäure 18:2 9-cis,12-cis-Octadecadiensäure	
Linolensäure 18:3 9-cis,12-cis,15-cis-Octadecatriensäure	
Stearidonsäure 18:4 6-cis,9-cis,12-cis,15-cis-Octadecatetraensäure	
Eicosensäure 20:1 11-cis-Eicosensäure	
Vaccensäure 18:1 11-cis-Octadecensäure	
Eicosatriensäure 20:3 11-cis,14-cis,17-cis-Eicosatriensäure	
Arachidonsäure 20:4 5-cis,8-cis,11-cis,14-cis-Eicosatetraensäure	
Eicosapentaensäure 20:5 5-cis,8-cis,11-cis,14-cis,17-cis-Eicosapentaensäure	
Docosahexaensäure 22:6 4-cis,7-cis,10-cis,13-cis,16-cis,19-cis- Docosahexaensäure	

Erucasäure 22:1 13-cis-Docosensäure	
Palmitinsäure 16:0 Hexadecansäure	
Octansäure 8:0	
9-Decensäure 9:1	
Elaidinsäure 18:1 9-trans-Octadecensäure	
Ricinolsäure 18:1 12-Hydroxy-9-cis-Octadecensäure	

Thrombininhibitor vom 4-Amidinophenylalanin Typ (K_i Thrombin = 0,42 [$\mu\text{mol/l}$]; M_r = 570 * HJ):



Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] Bruhn, H.D. (2000). Pathophysiologie des Hämostasesystems. In: Fölsch, U.R., Kochsiek, K., Schmidt, R.F. (Hrsg.): Pathophysiologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- [2] Epstein, F.H. (1983). Epidemiologie und Risikofaktoren. In: Koller, F. (Hrsg.): Thrombose und Embolie. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York
- [3] Statistisches Bundesamt (2003). Bevölkerung Deutschlands bis 2050. [Online], URL: www.destatis.de/presse/deutsch/pk/2003/Bevoelkerung_2050.pdf
- [4] Schwabe, U. (2004). Antikoagulantien und Thrombozytenaggregationshemmer. In: Schwabe, U., Paffrath, D. (Hrsg.): Arzneiverordnungs-Report 2004. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- [5] Collins, B., Hollidge, C. (2003). Antithrombotic drug market. *Nat Rev Drug Discov*, 2, Januar, 11 – 12
- [6] Bernardo, A., Völler, H. (2001). Leitlinien Gerinnungsselbstmanagement. *Dtsch Med Wochenschr*, 126, 346 – 351
- [7] Blaeser-Kiel, G. (2003). Neue Dimensionen der Antikoagulation. *Dtsch Arztebl*, 100, 15, 1012
- [8] Sinnaeve, P.R., Van de Werf, F.J. (2004). Will oral antithrombin agents replace warfarin ? *Heart*, 90, 827 – 828
- [9] Stafford, R.S., Singer, D.E. (1998). Recent National Patterns of Warfarin Use in Atrial Fibrillation. *Circulation*, 97, 1231 – 1233
- [10] Stöllberger, C., Finsterer, J., Slany, J. (1998). Antithrombotische Behandlung von Patienten mit Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz in 155 österreichischen Krankenhausabteilungen. *Journal für Kardiologie*, 5, 12, 495 – 500
- [11] Deutsches Ärzteblatt (2005). Erhöhte Serumkonzentrationen der Transaminasen durch Exanta(R) (Ximelagatran, Melagatran). 102, 3, 159
- [12] Harder, S., Breddin, H.K. (2004). Antikoagulanzen im Überblick. *Pharm Unserer Zeit*, 33, 3, 172 – 179
- [13] Alban, S. (2004). Vom Naturstoff zum selektiven Faktor-Xa-Inhibitor. *Pharm Unserer Zeit*, 33, 3, 190 – 194
- [14] Beretz, A., Cazenave, J.P. (1991). Old and New Natural Products as the Source of Modern Antithrombotic Drugs. *Planta Med*, 57, Suppl. 1, S68 – S72
- [15] Gustafsson, D., Bylund, R., Antonsson, T. et. al (2004). A new oral anticoagulant : the 50-year challenge. *Nat Rev Drug Discov*, 3, August, 649 – 659

- [16] Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, M. (2003). Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981 – 2002. *J Nat Prod*, 66, 1022 – 1037
- [17] Feher, M., Schmidt, J.M. (2003). Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. *J Chem Inf Comput Sci*, 43, 218 – 227
- [18] Clardy, J., Walsh, C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature*, 432, Dezember, 829 – 837
- [19] Dobson, C.M. (2004). Chemical space and biology. *Nature*, 432, Dezember, 824 – 828
- [20] Koonin, E.V., Wolf, Y.I., Karev, G.P. (2002). The structure of the protein universe and genome evolution. *Nature*, 420, 218 - 223
- [21] Waldmann, H. (2003). Natürlich kombinatorisch – naturstoffgetriebene Wirkstoffentwicklung. *Nachrichten aus der Chemie*, 51, Februar, 126 – 131
- [22] Breinbauer, R., Vetter, I.R., Waldmann, H. (2002). Von Proteindomänen zu Wirkstoffkandidaten – Naturstoffe als Leitstrukturen für das Design und die Synthese von Substanzbibliotheken. *Angew Chem*, 114, 3002 – 3015
- [23] Rouhi, A.M. (2003). Betting on natural products for cures. *Chem Eng News*, 81, 41, 93 - 94, 96 - 98, 100 – 103
- [24] Baker, J.T., Borris, R.P., Carte, B. et. al (1995). Natural product drug discovery and development: new perspectives on international collaboration. *J Nat Prod*, 58, 9, 1325 – 1357
- [25] DiMasi, J.A., Hansen, R.W., Grabowski, H.G. (2003). The price of innovation : new estimates of drug development costs. *J Health Econ*, 22, 2, 151 – 85
- [26] Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov Today*, 5, 7, 294 – 300
- [27] Malone, M.H. (1983). The pharmacological evaluation of natural products – general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *J Ethnopharmacol*, 8, 127 - 147
- [28] Cordell, G.A. (1995). Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, 40, 6, 1585 – 1612
- [29] Goldsack, N.R., Chambers, R.C., Dabbagh, K. et. al (1998). Molecules in focus Thrombin. *Int J Biochem Cell Biol*, 30, 641 – 646
- [30] Schechter, I., Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, 27(2), 157-62
- [31] Huntington, J.A., Baglin, T.P. (2003). Targeting thrombin – rational drug design from natural mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*, 24, 11, 589 – 595

- [32] Bode, W., Stubbs, M.T. (1995). Struktur und Funktion des Thrombins. *Hämostaseologie*, 31, 269 – 284
- [33] Stubbs, M.T., Bode, W. (1995a). The clot thickens: clues provided by thrombin structure. *Trends Biochem Sci*, 23 – 28
- [34] Stubbs, M.T., Bode, W. (1995b). Structure and Specificity in Coagulation and Its Inhibition. *Trends Cardiovasc Med*, 5, 157 – 166
- [35] De Cristofaro, R., De Candia, E. (2003). Thrombin Domains : Structure, Function and Interaction with Platelet Receptors. *J Thromb Thrombolysis*, 15, 3, 151 – 163
- [36] Di Cera, E. (2003). Thrombin Interactions. *Chest*, 124, 11S – 17S
- [37] Di Cera, E., Dang, Q.D., Ayala, Y.M. (1997). Molecular mechanisms of thrombin function. *Cell Mol Life Sci*, 53, 701 – 730
- [38] Hall, S.W., Gibbs, C.S., Leung, L.L.K. (1997). Strategies for development of novel antithrombotics: modulating thrombin`s procoagulant and anticoagulant properties. *Cell Mol Life Sci*, 53, 731 – 736
- [39] Dang, Q.D., Vindigni, A., Di Cera, E. (1995). An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 5977 - 5981
- [40] Ruggeri, Z.M. (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*, 8, 11, 1227 – 1234
- [41] Savage, B., Cattaneo, M., Ruggeri, Z.M. (2001). Mechanisms of platelet aggregation. *Curr Opin Hematol*, 8, 270 – 276
- [42] Jackson, S.P., Schoenwaelder, S.M. (2003). Antiplatelet Therapy: In Search of the Magic Bullet. *Nat Rev Drug Discov*, Vol. 2, October, 1 – 15
- [43] Monroe, D.M., Hoffmann, M., Roberts, H.R. (2002). Platelets and Thrombin Generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1381 – 1389
- [44] Hoffmann, M. (2003). Remodeling the Blood Coagulation Cascade. *J Thromb Thrombolysis*, 16, ½, 17 – 20
- [45] Hoffmann, M., Monroe III, D.M. (2001). A Cell-based Model of Hemostasis. *Thromb Haemost*, 85, 958 – 65
- [46] Dahlbäck, B. (2005). Blood Coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med*, 257, 209 – 223
- [47] Dahlbäck, B. (2000). Blood coagulation. *Lancet*, 355, 1627 – 1632
- [48] Mann, K.G. (2003). Thrombin Formation. *Chest*, 124, 4S – 10S
- [49] Mann, K.G., Butenas, S., Brummel, K. (2003). The dynamics of Thrombin Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 17 - 25

- [50] Berezky, Z., Katona, E., Muszbek, L. (2003/2004). Fibrin Stabilization (Factor XIII), Fibrin Structure and Thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 33, 430 - 437
- [51] Spronk, H.M.H., Govers-Riemslog, J.W.P., ten Cate, H. (2003). The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays*, 25, 1220 – 1228
- [52] Kato, H. (2002). Regulation of Functions of Vascular Wall Cells by Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 539 – 548
- [53] Esmon, C. (2003). The Protein C Pathway. *Chest*, 124, 26S – 32S
- [54] Esmon, C., Gu, J.M., Xu, J. (1999). Regulation and functions of the protein C anticoagulant pathway. *Haematologica*, 84, 363 – 368
- [55] Roessner, A. (2004). Grundlagen zur Pathologie des Kreislaufs. *Grundmann - Allgemeine Pathologie*, Urban – Fischer Verlag, München, 249 – 280
- [56] Ostermann, H. (2000). Thrombosen und Embolien des arteriellen und venösen Systems. In: Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T., Zeidler, H. (Hrsg.): *Die Innere Medizin*. 10. Aufl. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York
- [57] Sellmayer, A., Spannagl, M. (1999). Pathogenese der arteriellen Thrombose. *Hämostaseologie*, Springer Verlag, Berlin, 581 – 588
- [58] Beck, E.A. (2004). Was sich hinter einem Gerinnsel alles verstecken kann. *Cardiovasc*, 2004, 1, 8 – 10
- [59] Riess, H. (2004). Pathophysiologie venöser Thromboembolien. *Pharm Unserer Zeit*, 3, 166 – 171
- [60] Loew, D. (2001). Thromboembolie, 228 – 243, in: Rietbrock, Staib, Loew (Hrsg.): *Klinische Pharmakologie*, 4. Aufl. Steinkopff Verlag Darmstadt
- [61] Römpp (1996), *Lexikon Chemie*, 10. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- [62] Moog, G. (1982). Gerben und Gerbstoffe. *Pharm Unserer Zeit*, 11, 5, 129 - 137
- [63] Bate-Smith, E.C., Swain, T. (1957) in *Comparative Biochemistry*; Mason, H.S., Florkin, A.M., Academic Press: New York, Vol. 3, S. 764
- [64] Guyot, S, Marnet, N., Drilleau, J.F. (2001). Thiolytic-HPLC Characterization of Apple Procyanidins Covering a Large Range of Polymerization States. *J Agric Food Chem*, 49, 1, 14 –20
- [65] Khanbabaee, K., van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Nat Prod Rep*, 18, 641 – 649
- [66] Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric*, 80, 1094 – 1117
- [67] Nuhn, P. (1997). *Naturstoffchemie*. 3. Aufl. Hirzel Verlag Stuttgart

- [68] Haslam, E. (1996). Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *J Nat Prod*, 59, 205 – 215
- [69] Clifford, M.N., Scalbert, A. (2000). Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 80, 1118 – 1125
- [70] Porter, L.J. (1989). Tannins – in J.B. Harborne [Ed.] *Methods in plant biochemistry*, Vol 1, Plant Phenolics, 389 – 419, Academic Press, London, U.K.
- [71] Hagerman, A.E. (2002). The tannin handbook. [Online], URL: www.users.muohio.edu/hagermae
- [72] Beecher, G. (2003). Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *J Nutr*, 133, 3248S – 3254S
- [73] Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T. (1993). Classification of Oligomeric Hydrolyzable Tannins and Specificity of Their Occurrence in Plants. *Phytochemistry*, 32, 507-522
- [74] Rasmussen, S.E., Frederiksen, H., Struntze Krogholm K. et. al (2005). Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res*, 49, 2, 159-74
- [75] Ferreira, D., Brandt, E.V., Coetzee, J. et. al (1999). Condensed Tannins in *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, Herz [Ed.], Springer Verlag, New York, S. 21 - 68
- [76] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79, 727 – 747
- [77] Scholz, E. (1994). Pflanzliche Gerbstoffe. *Dtsch Apoth Ztg*, 134, 34, 17 (3167) – 29 (3179)
- [78] Kaul, Ravindernath (1996). Pflanzliche Procyanidine Vorkommen, Klassifikation und pharmakologische Wirkung. *Pharm Unserer Zeit*, 25, 4, 175 – 185
- [79] Weisburger, J.H. (2001). Chemopreventive Effects of Cocoa Polyphenols on Chronic Diseases. *Exp Biol Med*, 226, 10, 891 – 897
- [80] De Lorgeril, M., Salen, P., Paillard, F. et. al (2002). Mediterranean diet and the French paradox: Two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease. *Cardiovasc Res*, 54, 503 – 515
- [81] Heller, F.R., Descamps, O., Hondekijn, J.C. (1998). LDL Oxidation : therapeutic perspectives. *Atherosclerosis*, 137 Suppl., S25 – S31
- [82] Sen, C.K., Bagchi, D. (2001). Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. *Mol Cell Biochem*, 216, 1 – 7

- [83] Koga, T., Meydani, M. (2001). Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr*, 73, 941 - 948
- [84] Estruch, R., Sacanella, E., Badia, E. et. al (2004). Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis*, 175, 117 - 123
- [85] Dell'Agli, M., Buscialà, A., Bosisio, E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res*, 63, 593 - 602
- [86] Rein, D., Paglieroni, T.G., Pearson, D.A. et. al (2000). Cocoa and Wine Polyphenols Modulate Platelet Activation and Function. *J Nutr*, 130, 2120S – 2126S,
- [87] Wollny, T., Aiello, L., Di Tommaso, D. et. al (1999). Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. *Br J Pharmacol*, 127, 747 – 755
- [88] Chen, S.X., Kini, R.M., Dong, H. (2001). A method for inhibiting clot formation using tannins from *Geum Japonicum*. *Singapore Pat. Appl. SG 98-3340 19980828*.
- [89] Dong, H., Chen, S.X., Kini, R.M. et. al (1998). Effects of Tannins from *Geum Japonicum* on the Catalytic Activity of Thrombin and Factor Xa of Blood Coagulation Cascade. *J Nat Prod*, 61, 11, 1356 – 1360
- [90] Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Nutr*, 130, 2073S – 2085S
- [91] Chung, K.T., Wong, T.Y., Wie, C.I. et. al (1998a). Tannins and Human Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 6, 421 – 464
- [92] Chung, K.T., Cheng-I, W., Johnson, M.G. (1998b). Are tannins a double-edged sword in biology and health ? *Trends in Food Science & Technology*, 9, 168 – 175
- [93] Desphande, SS, Cheryan, M., and Salunkhe, DK (1986). Tannin analysis of food products. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, 24, 402–49
- [94] Makkar, H.P.S. (1989). Protein Precipitation Methods of Quantitation of Tannins: A Review. *J Agric Food Chem*, 37, 1197 - 1202
- [95] Goldstein, J. L., Swain, T. (1965). The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry*, 4, 185 – 192
- [96] Reed, J.D., Horvarth, P.J., Allen, M.S. et. al (1985). Gravimetric determination of soluble phenolics including tannins from leaves by precipitation with trivalent ytterbium. *J Sci Food Agric*, 36, 225 – 226

- [97] Hagerman, A.E. (1987). Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J Chem Ecol*, 13, 437 – 449
- [98] Naczki, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A*, 1054, 95 – 111
- [99] Lazarus, S.A., Kelm, M.A., Wächter, G.A. et. al (2003). Analysis and purification of proanthocyanidin oligomers. *Methods in Polyphenol Analysis*, 267 – 283
- [100] Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossaud, F. et. al (1996). Polymeric Proanthocyanidins from Grape Skins. *Phytochemistry*, 43, 509 – 512
- [101] Degenhardt, A., Engelhardt, U.H., Wendt, S. et. al (2000). Isolation of Black Tea Pigments Using High-Speed Countercurrent Chromatography and Studies on Properties of Black Tea Polymers. *J Agric Food Chem*, 48, 5200 – 5205
- [102] Sun, B.S., Leandro, M.C., da Silva, J.M.R. et. al (1998). Separation of Grape and Wine Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization. *J. Agric Food Chem*, 46, 1390 – 1396
- [103] Reed, J.D. (1995). Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *J Anim Sci*, 73, 1516 – 1528
- [104] Lazarus, S., Adamson, G.E., Hammerstone, J.F. et. al (1999). High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Proanthocyanidins in Foods and Beverages. *J Agric Food Chem*, 47, 3693-3701
- [105] Guyot, S., Doco, T., Souquet, J.M. et. al (1997). Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. *Phytochemistry*, 44, 2, 351 – 357
- [106] Hammerstone, J.F., Lazarus, S.A., Mitchell, A.E. et. al (1999). Identification of Procyanidins in Cocoa (*Theobroma cacao*) and Chocolate Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*, 47, 490 – 496
- [107] Cheynier, V., Fulcrand, H. (2003). Analysis of polymeric proanthocyanidins and complex polyphenols. *Methods in Polyphenol Analysis*, 284 – 313
- [108] Vivas, N., Nonier, M.F., de Gaulejac, N.V. et. al (2004) Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 513, 247 – 256
- [109] Kennedy, J.A., Jones, G.P. (2001) Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. *J Agric Food Chem*, 49, 1740 – 1746

- [110] Cai, Y., Evans, F.J., Robert, M.F. et. al (1991). Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*, 30, 6, 2033 – 2040
- [111] Czochanska, Z., Foo, L.Y., Newman, R.H. et. al (1979). Direct Proof of a Homogeneous Polyflavan-3-ol Structure for Polymeric Proanthocyanidins. *J Chem Soc Chem Commun*, 375 – 377
- [112] Czochanska, Z., Foo, L.Y., Newman, R.H. et. al (1980). Polymeric Proanthocyanidins. Stereochemistry, Structural Units, and Molecular Weight. *J Chem Soc Perkin Trans I*, 2278 – 2285
- [113] Emken, E.A., Adlof, R.O., Gulley, R.M. (1994). Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic acids in young adult males. *Biochim Biophys Acta*, 1213, 277-88
- [114] McCowen, K., Bistrrian, B.R. (2005). Essential fatty acids and their derivatives. *Curr Opin Gastroenterol*, 21, 207-215
- [115] Wolfram, G. (2001). Vollwertige Ernährung schützt vor Herzinfarkt. *Biologie in unserer Zeit*, 6, 388-396
- [116] Nelson, D.L., Cox, M.M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4. Aufl. Freeman and Company, New York; 343 pp
- [117] Hänsel, R., Sticher, O. (2004). *Pharmakognosie – Phytopharmazie*. 7. Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; 203 pp
- [118] Thiele, O.W. (1979). *Lipide, Isoprenoide mit Steroiden*. Thieme Verlag, Stuttgart; 16 pp
- [119] Brockmann, R., Demmering, G., Kreutzer, U. et al (1987). Fatty Acids, 245-276 in: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, 5. Aufl. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- [120] Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2003). *Biochemie*. 5. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford; 349 pp
- [121] Kunau, W.H. (1976). *Chemie und Biochemie ungesättigter Fettsäuren*. *Angew Chem Weinheim Bergstr Ger*, 88, 4, 97-111
- [122] Michal, G (1999). *Biochemical Pathways*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford; 75 pp
- [123] Vicario, I.M., Malkova, D., Lund, E.K. et. al (1998). Olive Oil Supplementation in Healthy Adults: Effects in Cell Membrane Fatty Acid Composition and Platelet Function. *Ann Nutr Metab*, 42, 160 – 169
- [124] Katan, M.B., Deslypere, J.P., van Birgelen, A.P.J.M. et. al (1997). Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. *J Lipid Res*, 38, 2012 – 2022

- [125] Ricci, S., Patoia, L., Berrettini, M. et. al (1987). Fatty Acid Pattern of Red Blood Cell Membranes and Risk of Ischemic Brain Infarction: A Case-Control Study. *Stroke*, 18, 575 - 578
- [126] Siscovick, D.S., Raghunathan, T.E., King, E. (1995). Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *JAMA*, 274, 17, 1363 - 7
- [127] Wood, D.A., Riemersma, R.A., Butler, S. et. al (1987). Linoleic and eicosapentaenoic acids in adipose tissue and platelets and risk of coronary heart disease. *Lancet*, 1 (8526), 177 – 183
- [128] Kris-Etherton, P.M. (1999a). Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation*, 100, 1253-1258)
- [129] Serra-Majem, L., de la Cruz, J.N., Ribas, L., Salleras, L. (2003/2004). Mediterranean Diet and Health : Is all the Secret in Olive Oil ? *Phatophysiol Haemost Thromb*, 33, 461-465
- [130] Keys, A. (1970). Coronary heart disease in seven countries. *Circulation*, 41 (suppl.), 1-211
- [131] De Lorgeril, M., Renaud, S., Mamelle, N., Salen, P., Martin, J.L., Monjaud, I., Guidollet, J., Touboul, P., Delaye, J. (1994). Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in the secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet*, 343, 1454-1459
- [132] Renaud, S., de Lorgeril, M., Delaye, J., Guidollet, J., Jacquard, F., Mamelle, N., Martin, J.L., Monjaud, I., Salen, P., Touboul, P., (1995). Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am J Clin Nutr*, 61 (suppl.), 1360S-1367S
- [133] Hu, F.B., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Ascherio, A., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Hennekens, C.H., Willet, W.C. (1997). Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*, 337, 1491-1499
- [134] Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester A.D.M., Katan, M.B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*, 77, 1146-1155
- [135] Gardner, C.D., Kraemer, H.C. (1995). Monounsaturated Versus Polyunsaturated Dietary Fat and Serum Lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15, 1917-1927
- [136] Kris-Etherton, P.M., Pearson, T.A., Wam, , Y., Hagrove, R.L., Moriarty, K., Fishell, V., Etherton, T.D. (1999b). High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol und triacylglycerol concentrations, *Am J Clin Nutr*, 70, 1009-1015

- [137] Temple, N.J. (1996). Dietary fats and coronary heart disease. *Biomed Pharmacother*, 50, 261-268
- [138] Berry, E.M., Eisenberg, S., Friedlander, Y., Harats, D., Kaufman, N.A., Norman, Y., Stein, Y. (1992). Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids vs carbohydrates. *Am J Clin Nutr*, 56, 394-403
- [139] Kratz, M., Cullen, P., Kannenberg, F., Kassner, A., Fobker, M., Abuja, P.M., Assmann, G., Wahrburg, U. (2002). Effects of dietary fatty acids on the composition and oxidizability of low-density lipoprotein. *Eur J Clin Nutr*, 56, 72-81
- [140] Nielsen, N.S., Pedersen, A., Sandstrom, B., Marckmann, P., Hoy, C.E. (2002). Different effects of diets rich in olive oil, rapeseed oil and sunflower-seed oil on postprandial lipids and lipoprotein concentrations and on lipoprotein oxidation susceptibility. *Br J Nutr*, 87, 489-99
- [141] Pfaffendorf, M. (1994). Sauerstoffradikale und Artherosklerose. *Med Monatsschr Pharm*, 17, 4, 102-113
- [142] Kelly, C.N.M., Smith, R.D., Williams, C.M. (2001). Dietary monounsaturated fatty acids and haemostasis. *Proc Nutr Soc*, 60, 161 - 170
- [143] Miller, G.J. (2005). Dietary fatty acids and the haemostatic system. *Atherosclerosis*, 179, 213 - 227
- [144] Leaf, A. (2002). On the Reanalysis of the Gissi-Prevenzione. *Circulation*, 105, 1874-1875
- [145] De Caterina, R., Basta, G. (2001). N-3 Fatty acids and the inflammatory response – biological background. *Eur Heart J Supplements*, 3 (Suppl D), D42-D49
- [146] Simopoulos, A.P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr*, 70 (suppl), 560S-9S
- [147] Hayes, K.C. (2000). Dietary fatty acids, cholesterol, and the lipoprotein profile. *Br J Nutr*, 84, 397-399
- [148] Kris-Etherton, P.M., Yu, S. (1997). Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*, 65 (suppl 5), 1628S-1644S
- [149] Spady, D.K., Dietschy, J.M. (1988). Interaction of dietary cholesterol and triglycerides in the regulation of hepatic low density lipoprotein transport in the hamster. *J Clin Invest*, 8, 300-9
- [150] Woollett, L.A., Spady, D.K., Dietschy, J.M. (1992). Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *J Lipid Res*, 33, 77-88

- [151] Dietschy, J.M. (1998). Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations. *J Nutr*, 128 (suppl 2), 444S-448S
- [152] Hiroyasu, I., Shinichi, S., Utako, U. et. al (2002). Linoleic Acid, Other Fatty Acids, and the Risk of Stroke. *Stroke*, 33, 2086-2093
- [153] Kark, J.D., Kaufmann, N.A., Binka, F. et. al (2003). Adipose tissue n-6 fatty acids and acute myocardial infarction in a population consuming a diet high in polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr*, 77, 796-802
- [154] Berry, E.M., Eisenberg, S., Friedlander, Y. et. al (1991). Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins – The Jerusalem Nutrition Study. I. High MUFA vs high PUFAs. *Am J Clin Nutr*, 53, 899-907
- [155] Berry, E.M., Eisenberg, S., Friedlander, Y. et. al (1995). Effects of diet rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins – The Jerusalem Nutrition Study. III. Monounsaturated vs saturated fatty acids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 5, 55-62
- [156] Henning, B., Toborek, M., Joshi-Barve, S. (1996). Linoleic acid activates nuclear transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and induces NF-kappa B-dependent transcription in cultured endothelial cells. *Am J Clin Nutr*, 63, 322-328
- [157] Toborek, M., Lee, Y.W., Garrido, R. (2002). Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *Am J Clin Nutr*, 75, 1, 119-25
- [158] Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J. (2003). Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, e20-e31
- [159] Dyerberg, J., Bang, H.O., Hjorne, N. (1975). Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr*, 28, 958-66
- [160] Bang, H.O., Dyerberg, J., Hjorne, N. (1976) The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med Scand*, 200, 1-2, 69-73.
- [161] Burr, M.L., Fehily, A.M., Gilbert, J.F. et al. (1989). Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial. *Lancet*, 2, 757-61
- [162] Lancet. (1999) Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*, 354, 447-55.

- [163] Nilsen, D.W., Albrektsen, G., Landmark, K. et al. (2001). Effects of a high dose concentrate of n-3 fatty acids or corn oil introduced early after an acute myocardial infarction on serum triacylglycerol and HDL cholesterol. *Am J Clin Nutr*, 74, 50-6
- [164] Marckmann, P., Gronbaek, M. (1999). Fish consumption and coronary heart disease mortality. A systematic review of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr*, 53, 585-90
- [165] Harris, W.S. (1997). N-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*, 65, 1645S-1654S
- [166] Leaf, A., Kang, J.X., Xiao, Y-F., et. al (1999). The Antiarrhythmic and Anticonvulsant Effects of Dietary N-3 Fatty Acids. *J Membr Biol*, 172, 1-11
- [167] Kang, J.X., Leaf, A. (2000). Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr*, 71 (suppl):202S-7S
- [168] Hahn, N., Ströhle, A. (2004). Omega-3-Fettsäuren. *Chem Unserer Zeit*, 38, 310-318
- [169] Thies, F., Garry, J.M.C., Yaqoob, P. et. al (2003). Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: A randomized controlled trial. *Lancet*, 361, 477-485
- [170] Howe, P.R. (1997) Dietary fats and hypertension: focus on fish oil. *Ann N Y Acad Sci*, 827, 339-352
- [171] Morris, M.C., Sacks, F., Rosner, B. (1993) Does fish oil lower blood pressure ? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation*, 88, 523-533
- [172] Abeywardena, M.Y., Head, R.J. (2001) Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. *Cardiovasc Res*, 52, 361-371
- [173] Mutanen, M., Freese, R. (2001). Fats, lipids and blood coagulation. *Curr Opin Lipidol*, 12, 25 – 29
- [174] Johansen, O., Seljeflot, I., Hostmark, A.T. et. al (1999). The effect of supplementation with Omega-3 fatty acids on soluble markers of endothelial function in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 1681-1686
- [175] Archer, S.L., Green, D., Chamberlain, M. et. al (1998). Association of dietary fish and n-3 fatty acid intake with hemostatic factors in the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 1119-1123
- [176] Lichtenstein, A.H. (1997). Trans Fatty Acids, Plasma Lipid Levels, and Risk of Developing Cardiovascular Disease. *Circulation*, 95, 2588
- [177] Angioni, E., Lercker, G., Frega, N.G. (2002). UV spectral properties of lipids as a tool for their identification. *Eur J Lipid Sci Technol*, 104, 59 - 64

- [178] Gutnikov, G. (1995). Fatty acid profiles of lipid samples. *J Chromatogr B*, 671, 71 – 89
- [179] Somashekar, D., Venkateshwaran, G., Srividya, C. et. al (2001). Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures. *World J Microbiol Biotechnol*, 17, 317 – 320
- [180] Mehta, A., Oeser, A.M., Carlson, M.G. (1998). Rapid quantitation of free fatty acids in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*, 719, 9 – 23
- [181] Lima, E.S., Abdalla, D.S.P. (2002). High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Anal Chim Acta*, 465, 81 – 91
- [182] Brondz, I. (2002). Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Anal Chim Acta*, 465, 1 – 37
- [183] Chen, S.H., Chuang, Y.J. (2002). Analysis of fatty acids by column liquid chromatography. *Anal Chim Acta*, 465, 145 – 155
- [184] Seppänen-Laakso, T., Laakso, I., Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Anal Chim Acta*, 465, 39 – 62
- [185] Christie, W.W. (1998). Some recent advances in the chromatographic analysis of lipids. *Analisis*. 26, 3, M34 – M40
- [186] Christie, W.W. (2002). Unusual gas chromatographic properties of fatty acid pyrrolidides. *Eur J Lipid Sci Technol*, 104, 69 – 70
- [187] Spitzer, V. (1999). Screening analysis of unknown seed oils. *Fett - Lipid*, 101, 1, 2 – 19
- [188] Momchilova, S., Nikolova-Damyanova, B. (2003). Stationary phases for silver ion chromatography of lipids: Preparation and properties. *J Sep Sci*, 26, 261 - 270
- [189] Dobson, G., Christie, W.W., Nikolova-Damyanova, B. (1995). Silver ion chromatography of lipids and fatty acids. *J Chromatogr B*, 671, 197 – 222
- [190] Myher, J.J., Kuksis, A. (1995). General strategies in chromatographic analysis of lipids. *J Chromatogr B*, 671, 3 – 33
- [191] Krütfeld, K. (2002). Zimt – der Duft des Paradieses. *Dtsch Apoth Ztg*, 142, 51/52, 52 – 59 (6254 – 6261)
- [192] Handbuch Phytotherapie (2003). Jänicke, C., Grünwald, J., Brendler, T., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- [193] Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis (1992a). 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Bd. 6, Drogen A - D, S. 884 – 911

- [194] Bertsche, T., Müller, U., Schulz, M. (2004). Zimt bei Diabetes. *Pharmazeutische Zeitung*, 149, 35, 28 (2990)
- [195] Khan, A., Safdar, M., Khan, M.M.A. et. al (2003). Cinnamom Improves Glucose and Lipids of People with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 26, 3215 - 3218
- [196] Safdar, M., Khan, A., Khan, M.M.A. et. al (2004). Effects of Various Doses of Cinnamom on Blood Glucose in Diabetic Individuals. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3, 5, 268 - 272
- [197] Verspohl, E. J., Bauer, K., Neddermann, E. (2005). Antidiabetic Effect of Cinnamomum cassia and Cinnamomum zeylanicum In vivo and In vitro. *Phytother Res*, 19, 203 – 206
- [198] Broadhurst, C.L., Polansky, M.M., Anderson, R.A. (2000). Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plants aqueous extracts in vitro. *J Agric Food Chem*, 48, 849 - 852
- [199] *Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen* (1999). Hiller, K., Melzig, M., Spektrum Verlag, Heidelberg, Bd. 1, A – K
- [200] *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis* (1992b). 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Bd. 6, Drogen A - D, S. 92 – 98
- [201] *Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen* (2000). Hiller, K., Melzig, M., Spektrum Verlag, Heidelberg, Bd. 2, L - Z
- [202] *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis* (1994a). 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Bd. 6, Drogen P – Z, 703 – 717
- [203] *Hunnus pharmazeutisches Wörterbuch* (1998). 8. Aufl., de Gruyter Verlag, Berlin, New York
- [204] *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis* (1994b). 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Bd. 6, Drogen P – Z, 574 - 586
- [205] Doljak, B., Stegnar, M., Urleb, U. et. al (2000). Screening for selective thrombin inhibitors in mushrooms. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 12, 123-128
- [206] De Medeiros, J.M.R., Macedo, M., Contancia, J.P. et. al (2000). Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores. *J Ethnopharmacol*, 72, 157-165
- [207] Goun, E.A., Petrichenko, V.M., Solodnikov, S.U. et. al (2002). Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *J Ethnopharmacol*, 81, 337-342
- [208] Kajadphai, A, Vimokesant, S, Panijpan, B. (1982). Precipitation of thiamine and tannic acid by calcium and magnesium cations. *Int J Vitam Nutr Res*, 52, 1, 102-3

- [209] Zhu, M., Phillipson, J.D., Greengrass, P.M. et. al (1997). Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein ? *Phytochemistry*, 44, 3, 441-7.
- [210] McGovern, S.L., Caselli, E., Grigorieff, N. et. al (2002). A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening. *J Med Chem*, 45, 1712-1722
- [211] Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. et. al (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 1, 46, 1-3, 3-26
- [212] Ryan, A.J., Gray, N.M., Lowe, P.N. et. al (2003). Effect of Detergent on "Promiscuous" Inhibitors. *J Med Chem*, 46, 16, 3448 –3451
- [213] Mlinaric, A., Kreft, S., Umek, A. et. al (2000). Screening of selected plant extracts for in vitro inhibitory activity of HIV-1 reverse transcriptase (HIV-1 RT). *Pharmazie*, 55, 1, 75-77
- [214] Au, T.K., Lam, T.L., Ng, T.B. et. al (2001). A comparison of HIV-1 integrase inhibition by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sci*, 68, 1687-1694
- [215] Inokuchi, J.I., Okabe, H. Yamauchi, T. et. al (1984). Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme in Crude Drugs. I. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 32, 9, 3615-3619
- [216] Inokuchi, J.I., Okabe, H. Yamauchi, T. et. al (1985). Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme in Crude Drugs. II. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 33, 1, 264-269
- [217] Richardson, M (1977). The Proteinase Inhibitors of plants and micro-organisms. *Phytochemistry*, 16, 159-169
- [218] Shanmugam, M., Mody, K.H. (2000). Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Curr Sci*, 79, 12, 1672-1683
- [219] Pereira, M.S., Mulloy, B., Mourao, A.S.(1999). Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Fucans. *J Biol Chem*, 274, 12, 7656-7667
- [220] Claeson, P., Gransson, U., Johansson, S. et. al (1998). Fractionation Protocol for the Isolation of Polypeptides from Plant Biomass. *J Nat Prod*, 61, 77-81
- [221] Palomino, S.S., Abad, M.J., Bedoya, L.M. et. al (2002). Screening of South American Plants against Human Immunodeficiency Virus: Preliminary Fractionation of Aqueous Extract from *Baccharis trinervis*. *Biol Pharm Bull*, 25, 9, 1147-1150

- [222] Cardellina II, J.H., Munro, M.H.G., Fuller, R.W. et. al (1993). A chemical screening strategy for the dereplication and prioritization of HIV-inhibitory aqueous natural products extracts. *J Nat Prod*, 56, 7, 1123-1129
- [223] Tan, G.T., Pezzuto, A., Kinghorn, A.D. (1991). Evaluation of natural products as inhibitors of Human Immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *J Nat Prod*, 54, 1, 143 - 154
- [224] Cray, J.C. (1978). Absorption of polyphenols by polyvinylpyrrolidone and polystyrene resins. *Phytochemistry*, 17, 495 - 497
- [225] Wall, M.E., Taylor, H., Ambrosio, L. et. al (1969). Plant Antitumor Agents III: A Convenient Separation of Tannins from Other Plant Constituents. *J Pharm Sci*, 58, 7, 839 - 841
- [226] Wall, M.E., Wani, C., Brown, D.M. et. al (1996). Effect of tannins on screening of plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. *Phytomedicine*, 3, 3, 281 - 285
- [227] Hagerman, A.E., Bulter, L.G. (1978). Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins. *J Agric Food Chem*, 26, 4, 809 – 812
- [228] Hagerman, A.E., Rice, M.E., Ritchard, N.T. (1998). Mechanisms of Protein Precipitation for Two Tannins, Pentagalloyl Glucose and Epicatechin16 (4->8) Catechin (Procyanidin). *J Agric Food Chem*, 46, 2590-2595
- [229] Kawamoto, H., Nakatsubo, F., Murakami, K. (1996). Stoichiometric Studies of Tannin-Protein Co-Precipitation. *Phytochemistry*, 41, 5, 1427-1431
- [230] Naczki, M., Oickle, D., Pink, D. et. al (1996). Protein Precipitating Capacity of Crude Canola Tannins: Effect of pH, Tannin, and Protein Concentrations. *J Agric Food Chem*, 44, 2144 – 2148
- [231] McMurrough, I., Madigan, D., Smyth, M.R. (1995). Adsorption by Polyvinylpyrrolidone of Catechins and Proanthocyanidins from Beer. *J Agric Food Chem*, 43, 2687-2691
- [232] Gegenheimer, P. (1990). Preparation of Extracts from Plants. *Methods Enzymol*, 182, 14, 174-193
- [233] Baxter, N.J., Lilley, T.H., Haslam, E., Williamson, M.P. (1997). Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. *Biochemistry*, 36, 5566 – 5577
- [234] Hagerman, A.E., Butler, L.G. (1981). The Specificity of Proanthocyanidin-Protein Interactions. *J Biol Chem*. 256, 9, 4494 – 4497
- [235] Toth, G.B., Pavia, H. (2001). Removal of Dissolved Brown Algal Phlorotannins Using Insoluble Polyvinylpyrrolidone (PVPP). *J Chem Ecol*, 27, 9, 1899-1910

- [236] Molyneux, P., Frank, H.P. (1961). The Interaction of Polyvinylpyrrolidone with Aromatic Compounds in Aqueous Solution. Part I. Thermodynamics of the Binding Equilibria and Interaction Forces. *J Am Chem Soc*, 83, 15, 3169-3180
- [237] Cai, Y., Gaffney, S.H., Lilley, T.H. et. al (1990). Polyphenol Interactions. Part 4. Model Studies with Caffeine and Cyclodextrins. *J Chem Soc Perkin Trans 2*, 2197-2209
- [238] Martin, R., Lilley, T.H., Bailey, N.A. et. al (1986). Polyphenol-Caffeine Complexation. *J Chem Soc Chem Commun*, 105-106
- [239] Siebert, K.J., Troukhanova, N.V., Lynn, P.Y. (1996). Nature of Polyphenol-Protein Interactions. *J Agric Food Chem*, 44, 80-85
- [240] Loomis, W.D., Battaile, J. (1966). Plant Phenolic Compounds and the Isolation of Plant Enzymes. *Phytochemistry*, 5, 423-438
- [241] Olsson, L., Samuelson, O. (1974). Chromatography of Aromatic Acids and Aldehydes and Phenols on Cross-Linked Polyvinylpyrrolidone. *J Chromatogr*, 93, 189-199
- [242] Andersen, R.A., Sowers, J.A. (1968). Optimum Conditions for Bonding of Plant Phenols to Insoluble Polyvinylpyrrolidone. *Phytochemistry*, 7, 293-301
- [243] Oh, H.I., Hoff, J.E., Armstrong, G.E. et. al (1980). Hydrophobic Interaction in Tannin-Protein Complexes. *J Agric Food Chem*, 28, 394-398
- [244] Fickel, J., Pitra, C., Joest, B.A. et. Al (1999). A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 122, 225-229
- [245] Kawamoto, H., Nakatsubo, F. (1997). Effects of Environmental Factors on Two-Stage Tannin-Protein Co-Precipitation. *Phytochemistry*, 46, 3, 479-483
- [246] McDonald, M., Mila, I., Scalbert, A. (1996). Precipitation of Metal Ions by Plant Polyphenols: Optimal Conditions and Origin of Precipitation. *J Agric Food Chem*, 44, 599-606
- [247] Deng, H., Van Berkel, G.J. (1998). Electrospray Mass Spectrometry and UV/Visible Spectrophotometry Studies of Aluminium(III)-Flavonoid Complexes. *J Mass Spectrom*, 33, 1080-1087
- [248] Ahrland, S. (1990). Complex equilibria, solvation and solubility. *Pure Appl Chem*, 62, 11, 2077-2082
- [249] Bravo, A., Anaconda, J.R. (2001). Metal complexes of the flavonoid quercetin: antibacterial properties. *Transition Metal Chemistry*, 26, 20-23
- [250] Ikezaki, A., Nakamura, M. (2002). Effects of Solvents on the Electron Configurations of the Low-Spin Dicyano[meso-tetrakis(2,4,6-triethylphenyl)porphyrinato]iron(III) Complex: Importance of the C-H~N Weak Hydrogen Bonding. *Inorg Chem*, 41, 2761 - 2768

- [251] Shibutani, S., Nagasawa, T., Oura, H. et. al (1983) Mechanism of the Blood Urea Nitrogen-decreasing Activity of Rhatannin from Rhei Rhizoma. *Chem Pharm Bull*, 31, 7, 2378 – 2385
- [252] Wang, B.H., Foo, L.Y., Polya, G.M. (1996). Differential inhibition of eukaryote protein kinases by condensed tannins. *Phytochemistry*, 43, 2, 359-365
- [253] Ammon, HPT, Kaul, R. (1994a). *Crataegus – Herz-Kreislauf-Wirkungen von Crataegusextrakten, Flavonoiden und Procyanidinen – Teil 2: Wirkungen auf das Herz*. *Dtsch Apoth Ztg*, 134, 27, 21 (2521) – 35 (2535)
- [254] Ammon, HPT, Kaul, R. (1994b). *Crataegus – Herz-Kreislauf-Wirkungen von Crataegusextrakten, Flavonoiden und Procyanidinen – Teil 2: Wirkungen auf den Kreislauf*. *Dtsch Apoth Ztg*, 134, 28, 35 (2631) – 42 (2636)
- [255] Koo, M.W.L., Cho, C.H. (2004). Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *Eur J Pharmacol*, 500, 177 - 185
- [256] Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Moutounet, M. (1999) Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *J Agric Food Chem*, 47, 42 – 47
- [257] McManus, J.P., Davis, K.G., Beart, J.E. (1985). Polyphenol Interactions. Part 1. Introduction ; Some Observations on the Reversible Complexation of Polyphenols with Proteins and Polysaccharides. *J Chem Soc Perkin Trans II*, 1429-1438
- [258] Nonaka, G.I., Morimoto, S., Nishioka, I. (1983). Tannins and Related Compounds. Part 13. Isolation and Structures of Trimeric, Tetrameric, and Pentameric Proanthocyanidins from Cinnamon. *J Chem Soc Perkin Trans I*, 2139 – 2145
- [259] Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F. (2002). Fractionation of Polymeric Procyanidins from Lowbush Blueberry and Quantification of Procyanidins in Selected Foods with an Optimized Normal-Phase HPLC-MS Fluorescent Detection Method. *J Agric Food Chem*, 50, 4852-4860
- [260] Hagerman, A.E., Butler L.G. (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *J Chem Ecol*, 15, 6, 1795-1810
- [261] Svedström, U., Vuorela, H., Kostianen, R. et. al (2002) Isolation and identification of oligomeric procyanidins from crataegus leaves and flowers. *Phytochemistry*, 60, 821 – 825
- [262] Sachs, L. (2002). *Angewandte Statistik*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio
- [263] Osborne, N.J.T., McNeill, D.M. (2001). Characterisation of *Leucaena* condensed tannins by size and protein precipitation capacity. *J Sci Food Agric*, 81, 1113-1119

- [264] Artz, W.E., Bishop, P.D., Dunker, A.K. et. al (1987). Interaction of Synthetic Proanthocyanidin Dimer and Trimer with Bovine Serum Albumin and Purified Bean Globulin Fraction G-1. *J Agric Food Chem*, 35, 417 - 421
- [265] Spencer, C.M., Cai, Y., Martin, R. et. al (1988). Polyphenol Complexation – Some Thoughts and Observations. *Phytochemistry*, 27, 8, 2397-2409
- [266] Frazier, R.A., Papadopoulou, A., Mueller-Harvey, I. et. al (2003). Probing Protein-Tannin Interactions by Isothermal Titration Microcalometry. *J Agric Food Chem*, 51, 5189-5195
- [267] Charlton, A.J., Baxter, N.J., Khan, M.L. et. al (2002). Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *J Agric Food Chem*, 50, 1593 - 1601
- [268] De Freitas, V., Mateus, N. (2001). Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins. *J Agric Food Chem*, 49, 940 – 945
- [269] Terencio, M.C., Sanz, M.J., Paya, M. (1991). Antihypertensive action of a procyanidin glycoside from *Rhamnus lycioides*. *J Ethnopharmacol*, 31, 1, 109 - 114
- [270] Wachsmuth, O.: *Rauvolfia serpentina* (L.) Bentham ex Kurz – Moderne Aspekte einer traditionellen Arzneipflanze. Dissertation, Marburg (2002)
- [271] Schleich, S. (2005). Nichtsteroidale Antiandrogene natürlichen und synthetischen Ursprungs zur Behandlung des Prostatakarzinoms. Dissertation Marburg.
- [272] Hara, A., Radin, N.S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem*, 90, 1, 420 – 426
- [273] Morrison, W.R., Smith, L.M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res*, 5, 600 – 608
- [274] Durst, H.D., Milano, M., Kikta, E.J. (1975). Phenacyl Esters of Fatty Acids via Crown Ether Catalysts for Enhanced Ultraviolet Detection in Liquid Chromatography. *Anal Chem*, 47, 1797 - 1801
- [275] CAS (2005). Property Searching in the CAS RegistrySM File. [Online], URL: www.cas.org/training/fallproperties.pdf
- [276] Iwanaga, S., Okada, M., Isawa, H. et. al (2003). Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Eur J Biochem*, 270, 1926-1934.
- [277] Helferich, B., Kleinschmidt, T. (1965). [On Data On Sweet Almond Emulsin.]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 340:31-45.
- [278] Bisswanger, H. (2000). *Enzymkinetik*. 3. Aufl., Wiley-VCH Verlag Weinheim
- [279] Silverman, R.B (1994). *Medizinische Chemie*. VCH Verlag, Weinheim,

- [280] Copeland, R.A. (2005). Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. Wiley Verlag, Hoboken, New Jersey
- [281] Macherey Nagel Produktinformation [Online]. URL: [https://www.macherey-nagel.de/web/MN-WEB-HPLCKatalog.nsf/web/NDURFLYER/\\$File/ndurflyer.pdf](https://www.macherey-nagel.de/web/MN-WEB-HPLCKatalog.nsf/web/NDURFLYER/$File/ndurflyer.pdf)
- [282] Parvin, R., Dakshinamurti, K. (1970). Inhibition of Gluconeogenic Enzymes by Free Fatty Acids and Palmitoyl Coenzyme A. *J Biol Chem*, 245, 21, 5773 – 5778
- [283] Lai, M.T., Di Cera, E., Shafer, J.A. (1997). Kinetic Pathway for the Slow to Fast Transition of Thrombin. *J Biol Chem*, 272, 48, 30275 – 30282
- [284] Ringbom, T., Huss, U., Stenholm, A. et. al (2001). Cox-2 Inhibitory Effects of Naturally Occurring and Modified Fatty Acids. *J Nat Prod*, 64, 745 – 749
- [285] Rennert, B., Melzig, M.F. (2002). Free Fatty Acids Inhibit the Activity of *Clostridium histolyticum* Collagenase and Human Neutrophil Elastase. *Planta Med*, 68, 767 – 769
- [286] Pande, S.V., Mead, J.F. (1968). Inhibition of Enzyme Activities by Free Fatty Acids. *J Biol Chem*, 243, 23, 6180 – 6185
- [287] Ito, M., Fukui, T., Saito, T. et. al (1987). Inhibition of acetoacetyl-Coa synthetase from rat liver by fatty acyl-CoAs. *Biochim Biophys Acta*, 922, 3, 287 – 293
- [288] Lin, C.Y., Lubin, B., Smith, S. (1976). Inhibition of platelet aggregation by acyl-CoA thioesters. *Biochim Biophys Acta*, 428, 1, 45 – 55
- [289] Cistola, D.P., Hamilton, J.A., Jackson, D. et. al (1988). Ionization and Phase Behavior of Fatty Acids in Water: Application of the Gibbs Phase Rule. *Biochemistry*, 27, 1881 – 1888
- [290] Wabnitz, P.A., Loo, J.A. (2002). Drug screening of pharmaceutical discovery compounds by micro-size exclusion chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 16, 85-91
- [291] Lenz, J., Matusch, R., Hoffmann, H.R. (1999). LTS Lohmann Therapie Systeme AG, Patent DE19945351.
- [292] Nikolic, D., Habibi-Goudarzi, S., Corley, D.G. et. Al (2000). Evaluation of Cyclooxygenase-2 Inhibitors Using Pulsed Ultrafiltration Mass Spectrometry. *Anal Chem*, 72, 3853-3859
- [293] Mejbaum-Katzenellenbogen, W., Dobryszczycka, W.M. (1962). Immunochemical Properties of the Serum Proteins after Regeneration from the Protein-Tannin Compounds. *Nature*, 193, 1288-1289
- [294] Bentley, R. (1955). Glucose Aerodehydrogenase (Glucose Oxidase). *Methods Enzymol*, 1, 340-345

- [295] Mejbaum-Katzenellenbogen, W., Dobryszczyka, W., Boguslawska-Jaworska, J. et. al (1959). Regeneration of Protein from Insoluble Protein-Tannin Compounds. *Nature*, 184, 1799-1800
- [296] Murray, N.J., Williamson, M.P., Lilley, T.H., Haslam, E. (1994). Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by 1H-NMR spectroscopy. *Eur J Biochem*, 219, 923 – 935
- [297] Luck, G., Liao, H., Murray, J. et. al (1994). Polyphenols, Astringency and Proline-Rich Proteins. *Phytochemistry*, 37, 2, 357 – 371
- [298] Ozawa, T., Lilley, T.H., Haslam, E. (1987). Polyphenol Interactions: Astringency and the loss of Astringency in Ripening Fruit. *Phytochemistry*, 26, 11, 2937-2942
- [299] Nelsestuen, G.L., Kisiel, W., Di Scipio, R.G. (1978). Interaction of Vitamin K Dependent Proteins with Membranes. *Biochemistry*, 17, 11, 2134 – 2138
- [300] Tracy, R.P. (1997). Assays for thrombosis factors: relation to plasma lipids. *Am J Clin Nutr*, 65 (5 Suppl), 1669S – 1673S
- [301] Bates, S.M., Weitz, J.I. (2005). Coagulation Assays. *Circulation*, 112, e53 – e60
- [302] Lefevre, M., Kris-Etherton, P.M., Zhao, G. et. al (2004). Dietary Fatty Acids, Hemostasis, and Cardiovascular Disease Risk. *J Am Diet Assoc*, 104, 410 - 419
- [303] Stürzebecher, J., Vieweg, H. (1995). Structure-Activity Relationships of Inhibitors derived from 3-Amidinophenylalanine. *J Enzyme Inhib*, 9, 87-99
- [304] Püttmann, M., Krug, H., von Ochsenstein, E. et. al (1993). Fast HPLC Determination of Serum Free Fatty Acids in the Picomole Range. *Clin Chem*, 39, 5, 825 - 832
- [305] Borch, R.F. (1975). Separation of Long Chain Fatty Acids as Phenacyl Esters by High Pressure Liquid Chromatography. *Anal Chem*, 47, 14, 2437 - 2439
- [306] Dole, V.P., Meinertz, H. (1960). Microdetermination of Long-chain Fatty Acids in Plasma and Tissues. *J Biol Chem*, 235, 9, 2595 - 2599

Lebenslauf für die Online-Ausgabe entnommen