Chemische und biochemische Untersuchungen von Pflanzeninhaltsstoffen aus *Calendula officinalis* und *Scorzonera hispanica* und ihre Wirksamkeit gegen Schlangengifte

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Chemikerin Kristina Jantzen

geboren am 12. September 1963 in Gräfenthal

1999

Referent: Prof. G. G. Habermehl

Koreferent: Prof. H. C. Krebs

Tag der Promotion: 20.11.1998

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. G. Habermehl im Zentrum für Lebensmittelwissenschaften der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Zentrumsabteilung für Chemische Analytik und Endokrinologie.

Herrn Prof. Habermehl möchte für seine stets wohlwollende Unterstützung herzlich danken.

Herrn Hubert Haarstrich danke ich für die Aufnahme der Spektren.

Ich danke Alison Richards für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der Tierversuche sowie Paula Sells für die Idee zu dem Ei-Test und das zur Verfügung gestellte Material. Bei Paul Rowley bedanke ich mich für faszinierende Begegnungen mit Giftschlangen und die Fotos.

Bei Herrn PD Dr. G. Glünder, Klinik für Geflügel der Tierärztlichen Hochschule Hannover, bedanke ich mich für wertvolle Anregungen zur Verbesserung der *in ovo*-Testmethode.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Chemischen Institutes bedanke ich mich für das wunderbare Arbeitsklima. Besonders Enkhmaa Dagvadorj und Roger Rafanomezantsoa danke ich für die gemeinsam verbrachte Zeit.

Natürlich danke ich auch meiner Familie für die moralische und technische Unterstützung.

Die Arbeit wurde finanziell gefördert durch ein Stipendium der Universität Hannover im Rahmen des HSP II.

Kristina Jantzen: Dissertation, Universität Hannover, 1998

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Pflanzen, die aufgrund von Überlieferungen bei Schlangenbissen Verwendung fanden, auf ihre antihämorrhagische Wirksamkeit gegen Schlangengifte untersucht und die aktiven Substanzen isoliert und charakterisiert.

Die Ringelblume (*Calendula officinalis*) wird seit langem therapeutisch genutzt. Die beiden anderen in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen Schwarzwurzel (*Scorzonera hispanica*) und Grüner Tee (*Camellia sinensis*) sind dagegen bisher eher als Lebensmittel bekannt.

Die Pflanzenextrakte wurden chromatographisch aufgetrennt und *in vivo* sowie *in ovo* auf ihre antihämorrhagische Aktivität untersucht. Die Extrakte von *Calendula officinalis* und *Scorzonera hispanica* wiesen eine antihämorrhagische Aktivität auf. Aus den aktiven unpolaren und mittel-polaren Teilextrakten der beiden Pflanzen wurden verschiedene Substanzen isoliert und mit spektroskopischen Methoden, vor allem ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie, identifiziert. Mit verschiedenen Reinsubstanzen erfolgten Bioassays, die zur Identifizierung der für die antihämorrhagische Wirkung verantwortlichen Substanzen führten.

Es wurde eine *in ovo*-Methode als Ersatz für die bisher notwendigen Tierversuche zur Untersuchung der antihämorrhagischen Aktivität gefunden. Die Methode wurde verbessert und konnte als screening eingesetzt werden.

Aus *Scorzonera hispanica* wurde eine Reihe von Triterpenverbindungen isoliert, die bisher noch nicht als Inhaltsstoffe der Pflanze bekannt waren.

Schlagworte:

Calendula officinalis, *Scorzonera hispanica*, antihämorrhagische Aktivität

Abstract

Plants known from the tradition as antidots against snakebites were examined for secondary metabolites and their antihaemorrhagic activity.

Pot Marygold (*Calendula officinalis*) is used therapeutically since long time. The other plants examined in this thesis Black Salsify (*Scorzonera hispanica*) and Green Tea (*Camellia sinensis*) are common known as food.

The alcoholic plant extracts of *Calendula officinalis* and *Scorzonera hispanica* showed *in vivo* antihaemorrhagic activity. From the active non-polar and middle-polar parts of the extracts have been isolated several compounds using chromatographic methods. Their structure elucidation was based on spectroscopic methods, particulary one- and two dimensional NMR. Bioassays of pure substances were performed to characterise their antihaemorrhagic activity.

A new *in ovo*-method for testing antihaemorrhagic activity was applied. During the tests the method has been improved and was used as screening.

From *Scorzonera hispanica* a number of triterpenes were isolated as new compounds.

Keywords:

Calendula officinalis, *Scorzonera hispanica*, antihaemorrhagic activity

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A Einleitung und Problemstellung 1

B Theoretische Grundlagen 3

1. Schlangen 3

1.1. Systematische Einteilung und Klassifizierung 3

1.2. Schlangengifte 4

1.3. Hämorrhagische Wirkung 5

1.4. *Echis leucogaster* 8

1.4.1. Allgemeine Beschreibung 8
1.4.2. Giftzusammensetzung 9

2. Anwendung von Pflanzen gegen Schlangengifte 11

3. *Calendula officinalis* L. 14

3.1. Systematik 14

3.2. Botanik 15

3.3. Herkunft und Verbreitung 17

3.4. Inhaltsstoffe 18

3.4.1. Triterpenglykoside 18
3.4.2. Triterpenalkohole 19
3.4.3. Sterole 21
3.4.4. Mono- und Sesquiterpene 22
3.4.5. Carotinoide 22
3.4.6. Flavone und Flavonoide 23
3.4.7. Cumarine 23
3.4.8. Carbonsäuren 24

3.4.9. Polysaccharide 24
3.4.10. Paraffine 25
3.4.11. Vitamine 25
3.4.12. N-haltige Verbindungen 25

3.5. Pharmakologie und Toxikologie 25

3.5.1. Pharmakologische Wirkungen 25
3.5.2. Toxikologie 27

4. *Scorzonera hispanica* L. 27

4.1. Vorkommen, Systematik, Botanik 27

4.2. Inhaltsstoffe der unterirdischen Pflanzenteile 29

4.2.1. Triterpene 29
4.2.2. Sterole 29
4.2.3. Flavonverbindungen 30
4.2.4. Carbonsäuren 30
4.2.5. Cumarine 32
4.2.6. Carotinoide 32
4.2.7. Weitere Inhaltsstoffe 32

4.3. Pharmakologie und Toxikologie 33

5. *Camellia sinensis* 33

5.1. Vorkommen, Systematik, Botanik 33
5.2. Inhaltsstoffe der Teeblätter 35
5.3. Pharmakologie und Toxikologie 35

C Isolierung und Untersuchung der Pflanzeninhaltsstoffe 37

1. Das Pflanzenmaterial 37

1.1. *Calendula officinalis* L. 37
1.2. *Scorzonera hispanica* L. 37
1.3. *Camellia sinensis* 37

2. Herstellung der Rohextrakte 38
3. Chromatographische Auftrennung 38
.

3.1. *Calendula officinalis* L. 38

3.1.1. Auftrennung in Teilextrakte und Fraktionierung 38
3.1.2. Isolierung und Identifizierung von ß-Sitosterol 1 40
3.1.3. Isolierung und Identifizierung von Sitosterol-3-O-glucosid 2 ..45
3.1.4. Isolierung und Identifizierung des Sitosterolderivates 3 48
3.1.5. Isolierung und Identifizierung von Bernsteinsäure-di-amid 4 52
3.1.6. Isolierung und Identifizierung von Rutin 5 60

3.2. *Scorzonera hispanica* L. 61

3.2.1. Auftrennung in Teilextrakte und Fraktionierung 61
3.2.2. Isolierung und Identifizierung von ß-Sitosterol 1 und Stigmasterol 6 63
3.2.3. Isolierung und Identifizierung von Sitosterol-3-O-glucosid 2 und 6''-Fettsäureester-Sitosterol-3-O-diglucosid 7 63
3.2.4. Isolierung und Identifizierung von Chlorogensäure 8 66
3.2.5. Isolierung und Identifizierung von 3-Axetoxy-urs-12-en 9 ..69
3.2.6. Isolierung und Identifizierung von 3-Oxo-urs-12-en 10 72
3.2.7. Isolierung und Identifizierung von α-Amyrin 11 75
3.2.8. Isolierung und Identifizierung von Urs-12-en-3ß-yl-linoleat 12 78

4. Untersuchung der antihämorrhagischen Wirksamkeit 80

4.1. *In vivo*-Tests 80

4.1.1. Durchführung 80
4.1.2. Ermittlung der Toxizität der Pflanzenextrakte 81
4.1.3. Ermittlung der mittleren letalen Dosis der Schlangengifte ...82
4.1.4. Ermittlung der neutralisierenden Wirkung eines Antidots 83
4.1.5. Untersuchung der hämorrhagischen Wirkung der Schlangengifte 84
4.1.6. Ermittlung der antihämorrhagischen Aktivität 86
4.1.7. Ergebnisse der *in vivo*-Tests 89

4.2. *In ovo*-Tests 90

4.2.1. Theoretische Grundlagen 90
4.2.2. Durchführung 91
4.2.3. Ermittlung der Minimalen Hämorrhagischen Dosis (MHD) ..93
4.2.4. Toxizitätstests 95
4.2.5. Ergebnisse der *in ovo*-Tests 96

4.3. Vergleich *in vivo* - *in ovo* 100

4.4. pH-Einflüsse bei den biologischen Tests 103

5. Antihämorrhagisch wirksame Substanzen 105

6. Zusammenfassung und Diskussion 109

D Experimenteller Teil

1. Herstellung der Pflanzenextrakte und Isolierung der Substanzen 112

1.1. Pflanzenmaterial 112
1.2. Extraktion 113
1.3. Auftrennung in Teilextrakte 114
1.4. Analytische Daten der isolierten Verbindungen 115

2. Lösungsmittel 120

3. Vergleichssubstanzen und Verbrauchsmaterialien 120

4. Chromatographie 121

4.1. Säulenchromatographie 121
4.2. Dünnschichtchromatographie 122
4.3. Präparative Dickschichtchromatographie 125
4.4. Reaktionschromatographie 126
4.4.1. Saure Hydrolyse von Glykosiden 126

5. Schmelzpunktbestimmung 126

6. pH-Werte 127

7. Spektroskopie 127

7.1. NMR 127
7.2. IR 128
7.4. Massenspektroskopie 128
8. *In vivo*-Tests 128

9. *In ovo*-Tests 130

E Anhang

Spektren der isolierten Verbindungen 132

Literatur 152

Liste der Veröffentlichungen 168

Verzeichnis der Abbildungen

Seite

Abb. 1: Schematischer Mechanismus der Aktivierung einer Metalloprotease 7
Abb. 2: *Echis leucogaster* 8
Abb. 3: Verbreitungsgebiet der Gattung Echis 10
Abb. 4: *Calendula officinalis* L. 17
Abb. 5: Ursprungsgebiet von *Calendula officinalis* L. 18
Abb. 6: Saponoside aus *C. officinalis* 20
Abb. 7: Triterpenalkohole mit ψ-Taraxenstruktur 21
Abb. 8: Triterpenalkohole mit Taraxenstruktur 21
Abb. 9: Triterpenalkohole mit Lupenstruktur 21
Abb. 10: Triterpenalkohole mit Oleanenstruktur 21
Abb. 11: Triterpenalkohole mit Ursenstruktur 22
Abb. 12: Carotinoide aus *C. officinalis* 23
Abb. 13: Isorhamnetin 24
Abb. 14: Cumarine 24
Abb. 15: *Scorzonera hispanica* L. 30
Abb. 16: Hydroxyzimtsäuren 32
Abb. 17: Epigallocatechin-3-gallat 37
Abb. 18: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung 4 56
Abb. 19: H-H-COSY-Spektrum der Verbindung 4 57
Abb. 20: Chlorogensäure 7 67
Abb. 21: Δ^{12}-Oleanen und Δ^{12}-Ursen 70
Abb. 22: 3-Acetoxy-urs-12-en 8 72
Abb. 23: 3-Oxo-urs-12-en 9 75
Abb. 24: α-Amyrin 10 78
Abb. 25: Urs-12-en-3ß-yl-linoleat 11 79
Abb. 26: MHD-Standardkurve für *Echis leucogaster* 85
Abb. 27: Ergebnisse der IA-MHD-Tests 87

Abb. 28: Gefäßsystem des Hühnerembryos 91
Abb. 29: *In ovo*-Test nach Sells 92
Abb. 30: *In ovo*-MHD-Standardkurve 94
Abb. 31: *In ovo*-Ergebnisse: *C. officinalis*-Rohextrakt × MHD *E. leucogaster* 96
Abb. 32: Antihämorrhagische Aktivität der untersuchten Substanzen, Vergleich *in ovo - in vivo* 102
Abb. 33: Koagulationstest mit Coffein 108
Abb. 34: ^{13}C-NMR-Spektrum von β-Sitosterol 1 132
Abb. 35: MS von β-Sitosterol 1 133
Abb. 36: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung 2 134
Abb. 37: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung 2 135
Abb. 38: MS der Verbindung 3 136
Abb. 39: IR-Spektrum der Verbindung 3 137
Abb. 40: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung 3 136
Abb. 41: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung 3 138
Abb. 42: IR-Spektrum der Verbindung 4 139
Abb. 43: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung 4 140
Abb. 44: MS der Verbindung 4 141
Abb. 45: ^{1}H-NMR-Spektrum von Chlorogensäure 8 142
Abb. 46: ^{13}C-NMR-Spektrum von Chlorogensäure 8 143
Abb. 47: MS von Chlorogensäure 8 141
Abb. 48: ^{1}H-NMR-Spektrum von Acetoxy-urs-12-en 9 144
Abb. 49: ^{13}C-NMR-Spektrum von Acetoxy-urs-12-en 9 145
Abb. 50: MS von Acetoxy-urs-12-en 9 146
Abb. 51: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung 10 147
Abb. 52: MS der Verbindung 10 146
Abb. 53: ^{1}H-NMR-Spektrum von α-Amyrin 11 148
Abb. 54: ^{13}C-NMR-Spektrum von α-Amyrin 11 149
Abb. 55: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung 12 150
Abb. 56: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung 12 151
Abb. 57: Massenspektrum von α-Amyrin 11 148

Verzeichnis der Tabellen

		Seite
Tabelle 1:	Gegen Schlangengift wirksame Pflanzen	13
Tabelle 2:	Phenolcarbonsäuren aus *C.officinalis* L.	25
Tabelle 3:	Phenolcarbonsäuren aus *S. hispanica* L.	33
Tabelle 4:	^{1}H-NMR-chemische Verschiebung von ß-Sitosterol 1	42
Tabelle 5:	^{13}C-chemische Verschiebungen von ß-Sitosterol 1	43
Tabelle 6:	^{13}C-chemische Verschiebungen von Sitosterol-3-O-glucosid 2	46
Tabelle 7:	^{13}C-chemische Verschiebungen der Verbindung 3	51
Tabelle 8:	IR-Daten der Verbindung 4	53
Tabelle 9:	^{1}H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung 4	55
Tabelle 10:	^{13}C-chemische Verschiebungen der Verbindung 4	57
Tabelle 11:	^{13}C-chemische Verschiebungen der Verbindung 7	65
Tabelle 12:	^{1}H-NMR-spektroskopische Daten von Chlorogensäure 8	67
Tabelle 13:	^{13}C-NMR-spektroskopische Daten von Chlorogensäure 8	68
Tabelle 14:	^{13}C-chemische Verschiebungen von Acetoxy-urs-12-en 9	70
Tabelle 15:	^{13}C-chemische Verschiebungen der Verbindung 10	74
Tabelle 16:	^{13}C-chemische Verschiebungen von α-Amyrin 11	76
Tabelle 17:	MLD der Pflanzenextrakte	81
Tabelle 18:	LD_{50} der Schlangengifte	82
Tabelle 19:	ED_{50} Resultate	83
Tabelle 20:	Ermittlung der MHD für *Echis leucogaster*	85
Tabelle 21:	MHD für Schlangengifte	86
Tabelle 22:	IA-MHD gegen *E. leucogaster*	88
Tabelle 23:	IA-MHD von *C. officinalis* gegen weitere Schlangengifte	89
Tabelle 24:	Ermittlung der *in ovo*-MHD	94

Tabelle 25: Ergebnisse der *in ovo*-Tests 97
Tabelle 26: Vergleich *in vivo*-*in ovo*-IA-MHD 100
Tabelle 27: pH-Einflüsse auf das Gift von *E. leucogaster* 103
Tabelle 28: pH-Werte der *in ovo*-Proben 104
Tabelle 29: Fließmittelgemische 123
Tabelle 30: ^{1}H- und ^{13}C-chemische Verschiebungen in deuterierten Lösungsmitteln 127

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ASIS	Aromatic Solvent Induced Shift
C.	*Calendula*
$CHCl_3$	Chloroform
CH_2Cl_2	Dichlormethan
COSY	Correlated Spectroscopy
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
DC	Dünnschichtchromatogramm
dc	dünnschichtchromatographisch
D/E	Diethylether/Essigester
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DGS	Dottersack-Gefäßsystem
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.	*Echis*
ED_{50}	mittlere effektive Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Schmelzpunkt
FAB	Fast Atom Bombardment
FM	Fließmittel
Gal	Galactose
Glu	Glucose
Glur	Glucuronsäure
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
IA	Inhibierende Aktivität
IR	infrarot

i.v.	intravenös
l	Liter
LD_{50}	mittlere letale Dosis
m	Multiplett
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MHD	minimale hämorrhagische Dosis
MLD	minimale letale Dosis
MS	Massenspektrum/-spektrometrie
m/z	Masse/Ladung
NMR	Kernmagnetische Resonanz
p. a.	pro analysi
PE	Petrolether
ppm	parts per million
q	Quartett
RP	Reversed Phase
S.	*Scorzonera*
s	Singulett
SC	Säulenchromatographie
sc	säulenchromatographisch
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TMS	Tetramethylsilan
UV	ultraviolettes Licht
VIS	Tageslicht
WHO	World Health Organisation
Zn	Zink

A Einleitung

Bißverletzungen durch einheimische Schlangen wie die Kreuzotter gehören heute mit ca. 250 Fällen/Jahr in Deutschland zu den Seltenheiten. Weltweit fordern Schlangenbisse jedoch jährlich mehr als 100 000 Todesopfer [1]. Allein für Westafrika muß nach statistischen Erhebungen mit 23 000 Todesfällen pro Jahr gerechnet werden [2].

Die Anwendung von Pflanzen gegen Schlangenbißvergiftungen kann mehrere Jahrhunderte zurückverfolgt werden. Es existieren dazu ethnobotanische Überlieferungen aus allen Teilen der Erde. Einen wissenschaftlichen Nachweis über die Wirksamkeit gibt es bisher aber nur durch wenige Forschungsarbeiten [3].

Die Suche nach neuen Behandlungsmethoden in der Schlangenbißtherapie hält an, da einerseits die konventionelle Verabreichung eines Antivenins (Serumtherapie) problembehaftet ist, andererseits neben der zunehmend technisierten Medizin zur Zeit auf fast allen Gebieten eine Rückbesinnung auf naturheilkundliche Medizin zu beobachten ist. Pflanzenextrakte sind wesentlich besser verträglich als die spezifischen Antiseren, die durch Hyperimmunisierung von Pferden hergestellt werden. Polyvalente Antiseren weisen einen hohen Proteingehalt auf und je nach Schwere der Intoxikation können bis zu 84 g Fremdeiweiß zur Behandlung notwendig sein [4]. Anaphylaktischer Schock oder Milzruptur sind nur zwei Beispiele für mögliche Nebenwirkungen. Viele Intoxikationen sind auch nicht so schwerwiegend, als daß ein Einsatz von Antiserum notwendig erscheint. Neben einer symptomatischen Therapie könnten in diesen Fällen pflanzliche Präparate eingesetzt werden. Eine zweite Problematik der Serumtherapie besteht darin, daß eine sachgerechte Behandlung abseits von größeren medizinischen Zentren meist schwer möglich ist, da das notwendige Serum unter tropischen Bedingungen nur begrenzt haltbar ist. Zudem besitzen Antiseren keinen therapeutischen Effekt gegen lokale Hautschädigungen wie die in dieser Arbeit untersuchten Hämorrhagien, die sich innerhalb weniger Minuten nach einem Schlangenbiß einstellen. Salben, Tinkturen oder andere galenische Zubereitungen auf Basis pflanzlicher

Wirkstoffe wären eine Erste-Hilfe-Maßnahme bis zur Aufnahme in medizinische Obhut.

Für ein screening wurden am Chemischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover 14 überwiegend einheimische Pflanzen, die aufgrund von Überlieferungen oder wegen ihres Namens (beispielsweise *Rauwolfia serpentina*) einen Bezug zu Schlangen besitzen, ausgewählt und *in vitro* sowie zum Teil *in vivo* auf ihre Wirksamkeit gegen Schlangengifte untersucht [5]. Zu den ausgewählten Pflanzen zählte unter anderem die Ringelblume (*Calendula officinalis*), die schon in der Antike als Heilpflanze Verwendung fand [6]. In den *in vivo*-Tests wurde eine Wirkung auf verschiedene Schlangengifte, unter anderem auf das Gift der Sandrasselotter (*Echis leucogaster*) nachgewiesen [7]. Der Isopropanol-Extrakt des *Calendula*-Krautes wies *in vivo* koagulationsverzögernde und antihämorrhagische Wirkungen auf und verminderte die letale Wirkung des Giftes. Desweiteren ergaben zusätzliche *in vivo*-Tests die antihämorrhagische Wirksamkeit von Extrakten aus den unterirdischen Pflanzenteilen der Schwarzwurzel (*Scorzonera hispanica*) [8].

Ziel vorliegender Arbeit war, neben der obligaten Suche nach neuen Inhaltsstoffen, aus den Extrakten der beiden o. g. Pflanzen - die übrigens zu der gleichen botanischen Familie Asteraceae gehören - einzelne Inhaltsstoffe zu isolieren, die für die beschriebenen Wirkungen verantwortlich gemacht werden können. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der antihämorrhagischen Wirkung. Durch chromatographische Trennmethoden sollte der Extrakt aufgetrennt werden, um aus Fraktionen, die sich als aktiv erweisen, mögliche aktive Einzelsubstanzen zu isolieren. Zur Durchführung der *in vivo* - Tests und aller anderen biologischen Tests wurde hauptsächlich das Gift von *Echis leucogaster* verwandt, weshalb im theoretischen Teil darauf besonders eingegangen wird.

B Theoretische Grundlagen

1. Schlangen

1.1. Systematische Einteilung und Klassifizierung

Rund 500 der insgesamt etwa 3300 Schlangenarten auf der Erde sind giftig. Diese Giftschlangen werden in fünf Familien unterteilt [1]:

1. *Elapidae* (Giftnattern, Kobras),
2. *Hydrophiidae* (Seeschlangen),
3. *Viperidae* (Vipern),
4. *Crotalidae* (Klapperschlangen, Grubenottern),
5. *Atractastaspididae* (Trugnattern) .

Zur Familie der Vipern gehören folgende Gattungen [9]:

Familie: Viperidae
Gattung: *Vipera* (Echte Ottern)
Echis **(Sandrasselottern)**
Cerastes (Hornvipern)
Pseudocerastes (Trug-Hornvipern)
Causus (Krötenottern)
Eristicophis (McMahon-Viper)
Atractaspis (Erdottern)
Atheris (Buschvipern)
Azemiops (Fea-Vipern)
Bitis (Puffottern).

Meistens werden Schlangen nach dem Bau ihres Gebisses klassifiziert. Die niederen, ungiftigen Schlangen haben eine Reihe gleichmäßiger Zähne, die höheren Giftschlangen weisen dagegen nur noch zwei Zähne auf.

1.2. Schlangengifte

Schlangengift ist ein Produkt der Ohrspeicheldrüse, es stellt ein komplexes Gemisch von Proteinen und Polypeptiden mit enzymatischen und toxischen Eigenschaften dar.

Die Giftzusammensetzung weist unter den Schlangenfamilien und unter den einzelnen Arten erhebliche Unterschiede auf. So enthalten Gifte beispielsweise der Kobras, Mambas oder Seeschlangen meist hochwirksame, niedermolekulare Toxine mit spezifischer Wirkung an der Nervenendplatte (Blockade der Erregungsüberleitung, Lähmung der Muskulatur). Vipern- und Klapperschlangengifte sind hingegen reich an Enzymen und greifen bevorzugt in die Blutgerinnung ein. Darüber hinaus bewirken sie häufig ausgedehnte Hämorrhagien und Nekrosen [10].

Bei den Toxinen sind Kardio- oder Membrantoxine, Neurotoxine, Hämotoxine und myonekrotisch wirkende Toxine von Bedeutung. Sie bestehen aus Peptiden mit meist 60 bis 70 Aminosäure-Resten, mit Ausnahme von Viperotoxin, welches ein Neurotoxin mit 108 Aminosäure-Resten ist. Die Primärstruktur vieler Schlangentoxine ist bekannt. Sie stellen sämtlich Peptidketten dar, die gefaltet durch Cystin-Brücken verknüpft sind. Zu den Enzymen zählen Phospholipasen, Endopeptidasen, Exopeptidasen, Proteinasen [1]. Bei den Viperidengiften spielen Proteasen eine große Rolle. Daneben findet man im Rohgift eine Vielzahl weiterer Stoffe wie anorganische Salze, Kohlenhydrate, Lipide, Nucleinsäuren, einige biogene Amine wie Acetylcholin und Tryptaminderivate sowie Metallionen, die zum Teil an Proteine gebunden sind [11].

1.3. Hämorrhagische Wirkung

Viele Schlangengifte, vor allem *Viperidae*- und *Crotalidae*-Gifte verursachen lokale und systemische Blutungen. Solche Hämorrhagien sind das Hauptmerkmal einer Vergiftung durch diese Schlangen.

Das klinische Vergiftungsbild einer Hämorrhagie zeigt sich wie folgt: Innerhalb weniger Minuten nach einer Vergiftung mit solchen Schlangengiften werden die Wände der Blutkapillaren zerstört. Die Enzyme des Giftes bauen die Hauptproteine der extrazellulären Matrix ab. Ursache dafür ist eine Proteolyse von Bestandteilen der Basalmembran. Es existiert eine direkte Korrelation zwischen der proteolytischen Aktivität der Metalloproteasen und ihrer hämorrhagischen Potenz [12].

Man unterscheidet zwei Mechanismen des Austretens von Erythrozyten und anderen Blutbestandteilen aus den Gefäßen [13]:

- *per diapedesis* (durch erweiterte Bahnen zwischen den Endotheliumzellen) oder
- *per rhexis* (durch Risse innerhalb der zerstörten Endotheliumzellen).

Außerdem wurden direkte zytotoxische Effekte auf Endotheliumzellen nachgewiesen [14].

Das Blut breitet sich im Gewebe um die zerstörten Kapillaren aus. Meist gleichzeitig entwickelt sich ein massives Ödem. Blasenbildung, Unterblutungen der Haut, welche aufbrechen, führen zu ausgedehnten Gewebsnekrosen, was mitunter zum Verlust einer Extremität führen kann. Gleichzeitige systemische Effekte der Vergiftung sind Veränderungen der Blutkoagulation oder Koagulopathie und Blutungen an von der Bißstelle weiter entfernten Stellen wie beispielsweise der Mundschleimhaut. Diese systemischen Hämorrhagien werden durch Einflüsse auf Blutplättchen und Plasmabestandteile, welche an der Hämostase beteiligt sind, verursacht, da Veränderungen an diesen Hämostasekomponenten in Blutungen resultieren [15].

Verschiedene Studien mit gereinigtem Gift haben gezeigt, daß Hämorrhagien auf Metalloproteasen zurückzuführen sind. DNA-Analysen ergaben multifunktionelle Enzyme mit einem N-terminalen Metalloprotein-Bereich und einem Cystein-reichen

C-Ende. Die meisten Metalloproteasen enthalten Zink. Sie variieren in ihrer Größe zwischen einem Molgewicht von 20 000 bis 100 000 [16].

Atomabsorptionsspektrometrische Untersuchungen der Metalloprotease A der Gemeinen Puffotter (*Bitis arietans*) ergaben einen Gehalt von einem Atom Zink pro Mol Protein. Das Molekulargewicht wird mit 24 800 angegeben [17]. Dieser Zinkgehalt kann auf die meisten Zn-haltigen Metalloproteasen übertragen werden. Dabei wurde durch Untersuchungen, bei denen Zink durch Komplexbildner wie EDTA chelatisiert wurde, nachgewiesen, daß die Anwesenheit von Zink für die hämorrhagische Aktivität notwendig ist [18].

In Übersichtsartikeln zu diesem Thema unterteilen sowohl Bjarnason und Fox [16] als auch Kini und Evans [19] Metalloproteasen nach ihrem Molgewicht:

1. kleine Metalloproteasen mit einem Molgewicht von 22 000 bis 27 000
2. mittlere Metalloproteasen mit einem Molgewicht von 47 000 bis 70 000
3. lange Metalloproteasen mit einem Molgewicht zwischen 80 000 und 100 000.

Röntgenstrukturanalysen der Kristallstruktur von Zn-haltigen Enzymen ergab für katalytisch wirkende Enzyme wie im Fall dieser Proteasen eine tetraedrische Struktur mit drei Aminosäureresten und einem reaktiven Wassermolekül als Liganden des Zink-Zentralatoms.

Die Metalloproteasen werden zunächst als inaktives, sog. Pro-Peptid synthetisiert und erst später in eine aktive Form umgewandelt. Diese Pro-Peptide enthalten einen Cysteinrest in Position 92 ihrer Peptidkette. Dieser Rest bildet mit dem Zink ein Mercaptid. Die Aktivierung des Enzyms erfolgt durch Abspaltung des Cysteins, dadurch entsteht aus dem energetisch stabilen tetraedrischen Zn-Komplex ein trigonaler Komplex. Die freie Koordinationsstelle wird durch ein H_2O-Molekül besetzt.

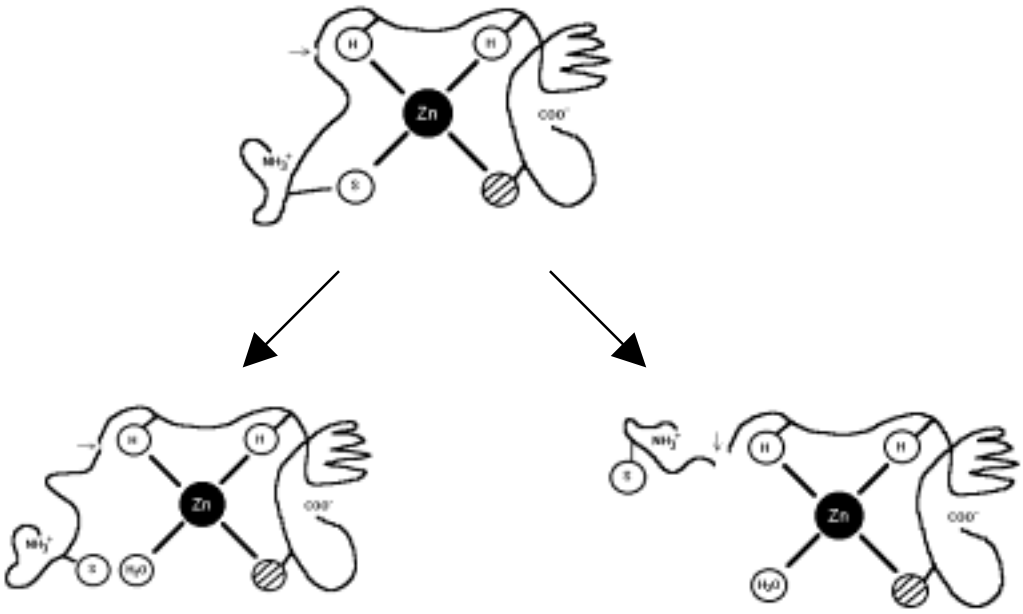


Abbildung 1: Schematischer Mechanismus der Aktivierung einer Metalloprotease nach [20]

Die Verdrängung des Cysteins wird verursacht entweder durch proteolytische Spaltung und/oder durch Konformationsänderungen. Die kleinen Pfeile deuten die Peptidregion an, an der voraussichtlich die autokatalytische Spaltung erfolgt. Die weiteren Liganden am Zink sind zwei Histidinmoleküle (H), der dritte Ligand konnte noch nicht genau identifiziert werden (mit Schrägstrichen gekennzeichnet).

Das fehlende Redoxpotential bewirkt die Stabilität von Zinkkomplexen in einem biologischen Medium, welches ansonsten ständigen Veränderungen unterliegt. Zink ist amphoter und existiert in der Nähe des Neutralitätspunktes sowohl in hydratisierter Form als auch als Hydroxid. Die Koordinationssphäre ist außerordentlich flexibel, die stereochemische Anpassungsfähigkeit des Zinkkomplexes in Enzymen stellt eines seiner eindrucksvollsten Merkmale dar.

Die Wirkung dieser Metalloproteasen stellt ein Beispiel für die immer größer werdende Anzahl von physiologischen Prozessen dar, die durch selektive enzymatische Spaltung von Peptidbindungen ausgelöst wird.

1.4. *Echis leucogaster*

1.4.1. Allgemeine Beschreibung

Abbildung 2: *Echis leucogaster*

Die Sandrasselotter *Echis leucogaster*, im Englischen Saw-scaled oder Carpet Viper, gehört zur Familie der Vipern. Sie ist eine vergleichsweise kleine, unauffällig aussehende Schlange mit einer durchschnittlichen Länge von 35 cm. Die Färbung variiert von sandfarben bis braun, mit kleinen hellen Flecken auf der Dorsalfläche.

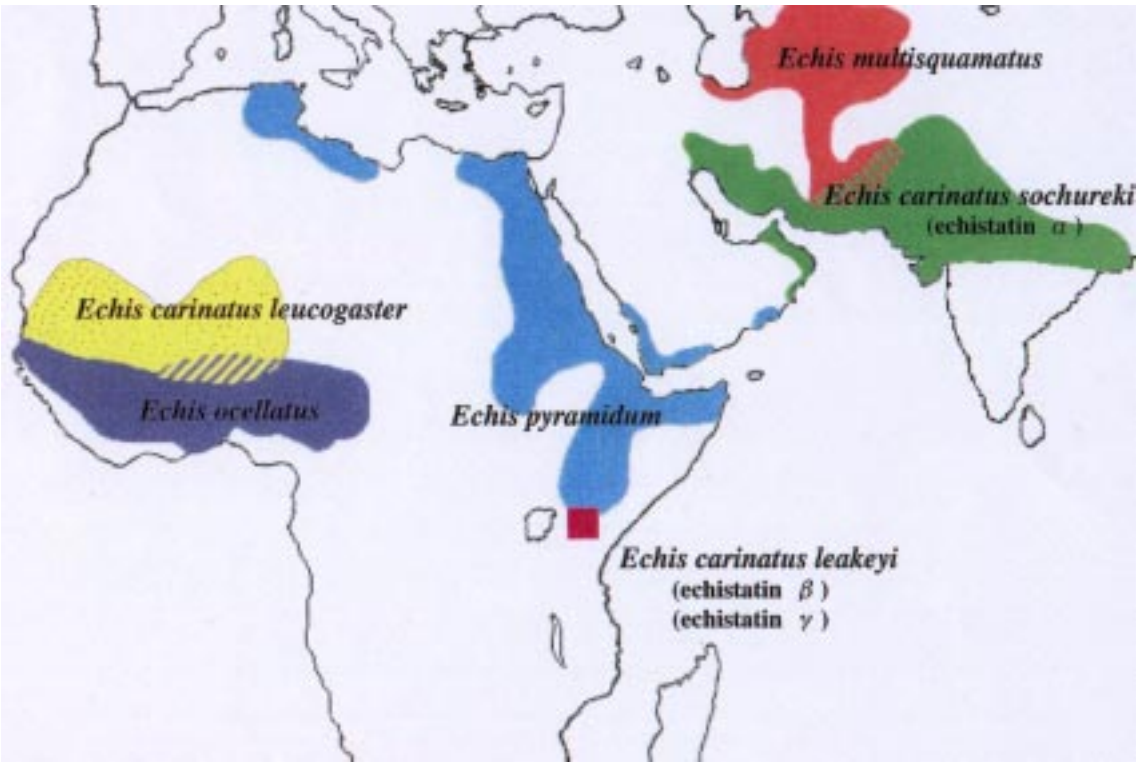
Der Kopf ist deutlich vom Körper abgesetzt. Die gekielten Körperschuppen rufen beim Aneinanderreiben ein rasselndes Geräusch hervor, was zu der Namensgebung Anlaß gab [21]. Sie ist in Nordafrika und Asien beheimatet, wobei sich aufgrund der Migration verschiedene Spezies mit voneinander abweichender Giftzusammensetzung ausgebildet haben.

Die Sandrasselotter *Echis leucogaster* ist nicht so scheu, wie man Schlangen üblicherweise nachsagt, sondern reagiert auf vermeintliche Bedrohungen sehr schnell mit einem Verteidigungsbiß. Statistiken besagen, daß sie mehr Menschen beißt und tötet als jede andere Schlangenart auf der Erde. In Teilen der nigerianischen Savannenregion belegen *Echis*-Bißopfer mitunter bis zu 10% aller Krankenhausbetten [23]. In Nigeria werden auf 100 000 Menschen ungefähr 120 Bisse pro Jahr gezählt, wobei nur die hospitalisierten Fälle erfaßt wurden [24]. Ein großer Teil der Bißopfer stirbt trotz Behandlung mit polyvalenten Antiseren und unterstützender Therapie, teilweise innerhalb weniger Stunden am kardiovaskulären Schock, teils einige Tage später an der Kombination von Kreislauf- und Gerinnungsstörungen [25].

1.4.2. Giftzusammensetzung von *Echis leucogaster*

Bei den *Echis*-Spezies haben sich sogenannte „chemische Rassen“ ausgebildet, das heißt, das Gift variiert in seiner Zusammensetzung in Abhängigkeit vom geographischen Lebensraum [1].

Abbildung 3: Verbreitungsgebiet der Gattung *Echis* [nach 22]



Das Gift von *Echis leucogaster* enthält folgende Komponenten [1]:

- Neurotoxine,
- hämorrhagische Faktoren,
- proteolytische Faktoren,
- Phospholipase,
- Hyaluronidase,
- Prokoagulatoren (Ecarin),
- Antikoagulatoren.

Die genaue chemische Zusammensetzung der für die Hämorrhagieauslösung verantwortlichen Metalloprotease(n) ist für die Gattung *Echis* bisher nicht bekannt.

2. Anwendung von Pflanzen gegen Schlangenbisse

Trotz der langen Tradition der Verwendung von Pflanzen gegen Schlangenbißvergiftungen gibt es bis heute keine systematischen Untersuchungen zu diesem Thema.

Bisher werden in der Literatur 578 höhere Pflanzen aus 94 Familien mit Wirkung auf Schlangengifte beschrieben [26]. Etwa 300, also mehr als die Hälfte, gehören zu nur 15 Familien, die meisten dieser Pflanzen gehören zu den Asteraceae (9%), zu denen auch die in dieser Arbeit untersuchten *Calendula officinalis* und *Scorzonera hispanica* zählen.

In der traditionellen Volksmedizin werden zur Behandlung von Schlangenbissen meist folgende Methoden angewandt:

- orale Aufnahme eines wässrigen Heiß- oder Kaltextraktes von ganzen Pflanzen oder Pflanzenteilen,
- der alkoholische Extrakt wird als alkoholisches Getränk verabreicht,
- die pulverisierte Droge wird als eine Art Dragee geschluckt und/oder
- die zerkleinerte und eingeweichte Droge wird als Umschlag verwendet, manchmal werden dazu noch Einschnitte an der Bißstelle vorgenommen.

Außerdem gibt es Mittel, die „prophylaktisch“ eingenommen werden, bevor man besonders gefährdete Gebiete betritt.

In den meisten Fällen ist eine genaue Identifizierung des Pflanzenmaterials für die Forscher sehr schwer. Oft fehlen zudem Angaben über die Zubereitungsart der als Antidot verwendeten Pflanzen.

Eine der wenigen Veröffentlichungen zu diesem Thema stammt von Onuaguluchi [25]. Er beschreibt Kenntnisse zur Behandlung von *Echis leucogaster*-Bissen, die ihm sein Vater überliefert hat. Aus der Pflanze *Diodia scandens* (Rubiaceae) wird eine Paste zubereitet, die auf die Bißstelle aufgetragen wird. Außerdem wird aus

dieser Paste ein Aufguß zubereitet, der den Patienten zum Trinken verabreicht wird. Das wird drei bis vier Mal täglich und drei Tage hintereinander durchgeführt. Die Pflanze wurde später näher untersucht. Die wasserlösliche Fraktion der oberirdischen Pflanzenteile reduzierte *in vivo* die Mortalitätsrate von 50 auf 10%, außerdem wurde *in vitro* eine koagulationszeitverzögernde Wirkung auf das Gift von *Echis leucogaster* nachgewiesen [27].

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über bisher untersuchte Pflanzen:

Tabelle 1: Gegen Schlangengift wirksame Pflanzen

Pflanze	Aktivität	Aktive Substanz	Literatur
Alocasia cucullata (*Araceae*)	inaktiviert Gift		[28]
Apuleia leiocarpa M. (*Caesalpiniaceae*)	inaktiviert Gift		[29]
Aristolochia sp. Radix (*Aristolochiaceae*)	inaktiviert Gift	Aristolochiasäure	[30]
„Cabeça de negro“ (Pflanze unbekannt)	inaktiviert Gift, anti-kardiotoxisch	Cabenegrin A-I und -II	[31]
Casearia sylvestris S. (Flacourtiaceae)	inaktiviert Gift, anti-myotoxisch		[26]
Cryptolepis sinensis M. (Asclepiadaceae)	inaktiviert Gift	Protocatechusäure	[32]
Curcuma sp. (Zingiberaceae)	antineurotoxisch		[33]
	antihämorrhagisch	ar-Turmeron	[34]
Diodia scandens (Rubiaceae)	inaktiviert Gift, anti-thromboplastisch		[25,27]

Fortsetzung der Tabelle:

Pflanze	Wirkung	aktive Substanz	Literatur
Diospyros kaki L. (Ebenaceae)	inaktiviert Gift, anti-neurotoxisch, anti-hämorrhagisch	Tannin	[35]
Eclipta prostrata L. (Asteraceae)	inaktiviert Gift, anti-myotoxisch, anti-hämorrhagisch	Wedelolacton, ß-Sitosterol, Stigmasterol	[36]
Gymnema sylvestre (Asclepiadaceae)	inhibiert ATPase	Gymnemasäuren	[37,38]
Mandevilla velutina M. (Apocynaceae)	Bradykininantagonist		[39]
Picrassma qu. Benn. (Simaroubaceae)	inaktiviert Gift		[40]
Rauwolfia serpentina (Apocynaceae)	prokoagulativ		[41]
Schumanniophyton magnificum H. (Rubiaceae)	inaktiviert Gift, anti-kardiotoxisch		[42,43,44]

Ein vielfach von Skeptikern der Phytotherapie verwendetes Argument, wonach viele Pflanzen Gifte gar nicht neutralisieren, wohl aber die Reaktionen und Symptome der Bißopfer positiv beeinflussen, kann durch neuere Untersuchungen widerlegt werden. Natürlich sind Reaktionen auf Schlangenbisse häufig irrational, und es läßt sich auch nicht immer sofort zweifelsfrei feststellen, ob es überhaupt eine giftige Schlange war, und wenn ja, ob nicht eventuell ein sogenannter „dry bite“ (ein Biß, bei dem kein Gift appliziert wurde) vorliegt. Angst und Panik können durch beruhigende Pflanzeninhaltsstoffe vermindert werden. Houghton vermutete zunächst, daß diese Erfahrung dazu führte, daß *Rauwolfia serpentina* in der indischen Volksmedizin zur Schlangenbißbehandlung eingesetzt wurde und machte

das in der Pflanze vorhandene Reserpin für die beruhigende Wirkung verantwortlich [45]. Experimentelle Untersuchungen mit *Rauwolfia*-Extrakten zeigen jedoch eindeutig einen koagulationszeitverzögernden Effekt [5,41]. Folglich müssen im Extrakt auf die giftinduzierte Koagulation wirksame Substanzen enthalten sein.

3. *Calendula officinalis* L.

3.1. Systematik

Aus der heutigen Gattung *Calendula* L. waren bis 1753, dem Jahr der Einführung der Prioritätsregeln in der taxonomischen Nomenklatur durch Carl von Linné, in Europa im wesentlichen zwei Arten bekannt: *Calendula officinalis*, die schon frühzeitig als Zier- und Heilpflanze kultiviert wurde, und die als Acker- und Weinbergsunkraut bezeichnete wilde *Calendula arvensis*. Bis Mitte des 20. Jahr-hunderts hinein wurden weitere Arten beschrieben und diverse Klassifizierungs-versuche der Gattung *Calendula* unternommen. Erst mit den Untersuchungen von Meusel und Ohle [46] bzw. Ohle [47,48,49], in denen neben vegetativen und floralen Merkmalen insbesondere die Chromosomenzahl als wesentliches Klassifizierungs-merkmal bestimmt bzw. einer Revision unterzogen wurde, schien eine eindeutige Gliederung der Gattung möglich.

Die Gattung *Calendula* L. ist systematisch wie folgt einzuordnen [50]:

Abteilung:	Spermatophyta (Samenpflanzen)
Unterabteilung:	Angiospermae (= Magnoliphytina, Bedecktsamer)
Klasse:	Dicotyledoneae (= Magnoliopsida, Zweikeimblättrige Bedecktsamer)
Unterklasse:	Asteridae
Überordnung:	Asteranae
Ordnung:	Asterales
Familie:	Asteraceae (= Compositae, Korbblütler)

Unterfamilie: Asteroideae (= Tubuliflorae)
Tribus: Calenduleae
Gattung: *Calendula* L.

Nach dem heutigen Stand umfaßt die Gattung *Calendula* L. insgesamt zwölf Arten.

Der Name Calendula leitet sich vermutlich aus dem lateinischen “calendae“, der Monatserste oder der Monat selbst, ab und bezieht sich wie der französische Name „fleur de tous le mois“ auf die lange Blütezeit der Pflanze. Möglicherweise ist der Name auch auf „calere“ (warm sein, kleines Wetterglas) zurückzuführen. Weil sich die Blüten im Rhythmus der Sonne öffnen und schließen dienten sie den Bauern als eine Art Barometer; waren sie frühmorgens noch geschlossen, konnte man mit Bestimmtheit Regen erwarten [51].

Der deutsche Name Ringelblume taucht erstmalig im 12. Jahrhundert in Form von „ringula“ oder „ringella“ auf und ist in den inneren ringförmig gekrümmten Früchten der Pflanze begründet. Weitere gebräuchliche Synonyme sind u.a. Goldblume, Studentenblume, Totenblume, Sonnenwendblume [52].

3.2. Botanik

Die Ringelblume ist einjährig oder überwinternd zweijährig. Sie wird 30 bis 50 cm hoch und hat eine etwa 20 cm lange gelblichweiße bis hellbraune Pfahlwurzel. Der krautige Stengel ist an der Basis verholzt und wenig oder erst in der oberen Hälfte verzweigt. Die wechselständigen, ganzrandigen Blätter sind 10 bis 15 cm lang und 3 bis 4 cm breit [53]. Die Infloreszenzen von *Calendula officinalis* L. sind entsprechen dem für die Familie der Asteraceae charakteristischem Grundschema als „Blütenköpfchen“ aufgebaut. Jeder Stengel trägt an seiner Spitze ein Blütenköpfchen mit einem Durchmesser von 2 bis 5 cm, welches aus ein- oder zweireihig angeordneten grünen, beidseitig dicht mit Drüsenhaaren besetzten Hüllblättern und hellgelb bis dunkelorange gefärbten randständigen Zungenblüten sowie den inneren gelben, bräunlichen oder roten Röhrenblüten gebildet wird [54].

Abbildung 4: *Calendula officinalis* L. [56]

3.3. Herkunft und Verbreitung

Über die Herkunft und Abstammung der Ringelblume gibt es unterschiedliche Angaben. Die gegen Ende des 19. Jahrhunderts allgemein bestehende Ansicht, *Calendula officinalis* L. sei nur in der Kultur entstanden, wurde von Ball 1878 angezweifelt [55]. Er vermutet ihr Ursprungsgebiet im Rif-Atlas zwischen Tetuan und Tanger (siehe Abbildung 5).

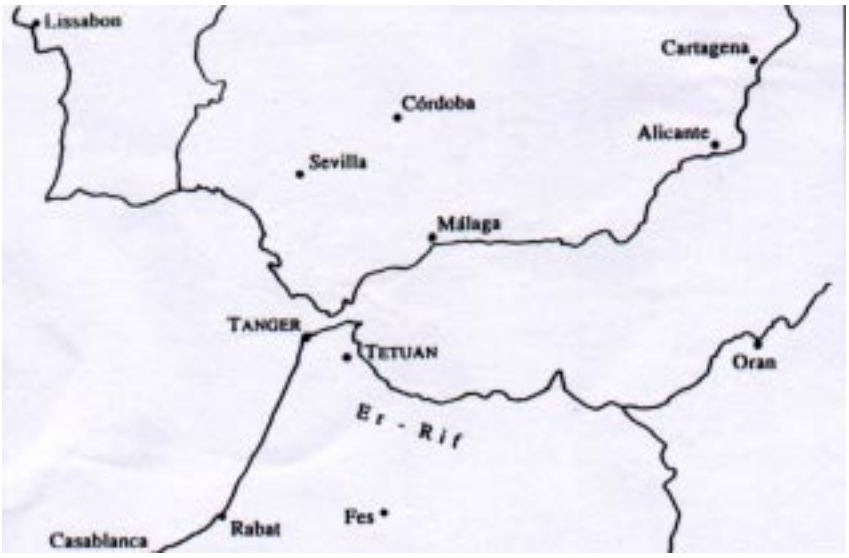


Abbildung 5: Ursprungsgebiet von *Calendula officinalis* L. [55]

Im 12. Jahrhundert wurde die Ringelblume in Deutschland nachweislich angebaut, zuerst in Klostergärten, später in Bauerngärten und auf Friedhöfen. Heute ist sie als Kultur-, Zier- und Arzneipflanze in Mittel- und Südeuropa, von Asien bis Nordafrika sowie in Nord- und Mittelamerika bekannt. Während sich das Verbreitungsgebiet in West-Ost-Richtung von den Kanaren bis Indien erstreckt, würde sie die Nordgrenze Mitteleuropas nicht überschreiten, wenn sie der Mensch nicht anbauen würde. So ist sie aber noch in Finnland anzutreffen. Im fernen Osten wurde sie bis nach Japan und Australien verschleppt, wo sie verwildert anzutreffen ist. Die Ringelblume gedeiht sogar noch auf dem Pamir-Plateau, wo sie als Gartenpflanze beliebt ist [57].

3.4. Inhaltsstoffe

Das Inhaltsstoffspektrum von *Calendula officinalis* L. wird geprägt durch einen hohen Anteil an Triterpenoiden. Die Farbe der Blüten wird durch den Gehalt an Carotinoiden bestimmt, der bis zu 1,5 % betragen kann. Orangefarbene Blüten enthalten Carotine, während die gelbblühenden Varietäten vorwiegend Xanthophylle enthalten. Unter den Flavonoiden sind vor allem die Isorhamnetinglykoside charakteristisch. Das ätherische Öl besteht aus Mono- und Sesquiterpenen. Außerdem sind organische Säuren, Polysaccharide, Paraffine, Cumarin-verbindungen, Vitamine und andere Verbindungen bekannt.

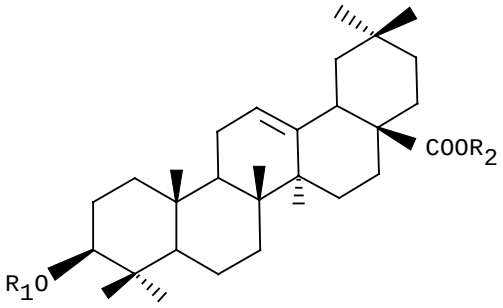
3.4.1. Triterpenglykoside

Oleanolsäureglykoside, auch Saponoside genannt, sind sowohl in den Wurzeln als auch in den oberirdischen Pflanzenteilen enthalten.

Wie Abbildung 6 zeigt, sind die Saponoside A bis F an der 3-OH-Gruppe der Oleanolsäure glykosidisch an D-Glucuronsäure gebunden, die ihrerseits an ß-D-Glucose und/oder ß-D-Galactose gebunden ist. Neben diesen Mono-desmosiden enthalten die Blüten Bidesmoside, bei denen die 28-Carboxylgruppe mit ß-D-Glucose verestert ist (28→1ß). Bei den Saponinen der Wurzel erfolgt die glykosidische Bindung an der 3-OH-Gruppe über Glucose.

Bezüglich der Zuckerreste und ihrer Verknüpfung liegen jedoch unterschiedliche Angaben vor. Die von Kasprzyk [58] und Wojciechowski [59] vorgeschlagenen Strukturen der Glykoside I-VIII sind nicht identisch mit den Calendulosiden A-H (entsprechen ihrer ansteigenden Polarität geordnet) von Vecherko et al. [60-66].

Abbildung 6: Saponoside aus *Calendula officinalis*



	R_1	R_2
Saponosid A	-Glur ⟨ Glu (2-1) / Gal (3-1)	-Glu
Saponosid B	-Glur ⟨ Glu (2-1) / Gal (3-1)	-H
Saponosid C	-Glur -Gal (3-1)	-Glu
Saponosid D	-Glur -Gal (3-1)	-H
Saponosid D_2	-Glur	-Glu
Saponosid F	-Glur	-H

3.4.2. Triterpenalkohole

Man unterscheidet hier Monole, Diole und Triole, deren Struktur sich von Taraxen, ψ-Taraxen, Lupen, Oleanen und Ursen ableiten (Abbildungen 7 bis 11). Alle Alkohole kommen frei oder verestert vor [67-70]. 10 % der Monole und 38 % der Diole sind verestert, die Monole mit Essigsäure, die Diole vorwiegend mit Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure. 98 % der Diole liegen als Monoester vor, nur 2 % als Diester [71].

Abbildung 7: Triterpenalkohole mit ψ-Taraxenstruktur

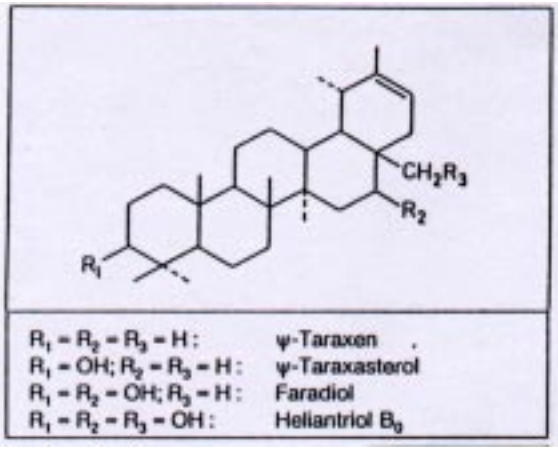


Abbildung 8: Triterpenalkohole mit Taraxenstruktur

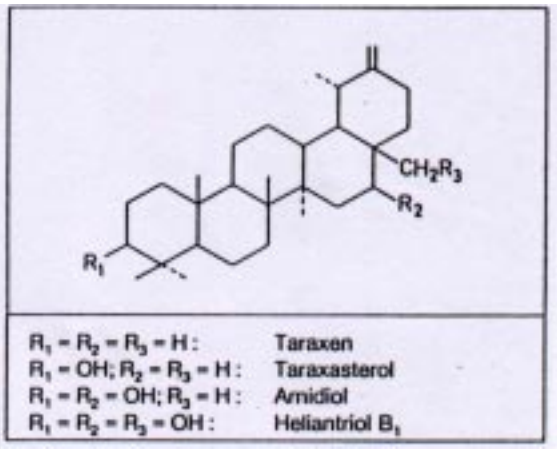


Abbildung 9: Triterpenalkohole mit Lupenstruktur

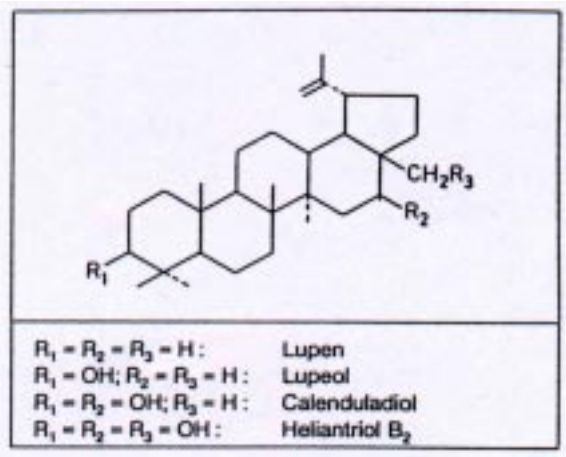
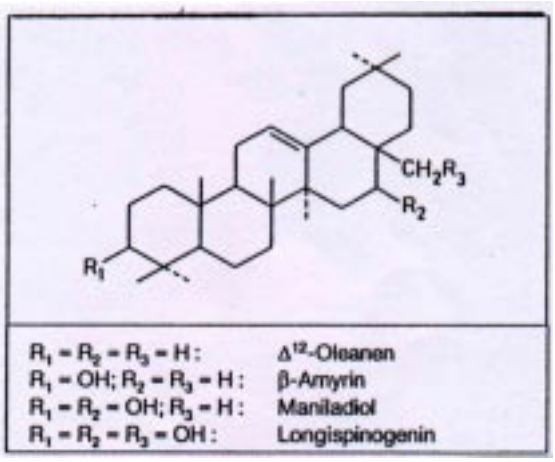


Abbildung 10: Triterpenalkohole mit Oleanenstruktur



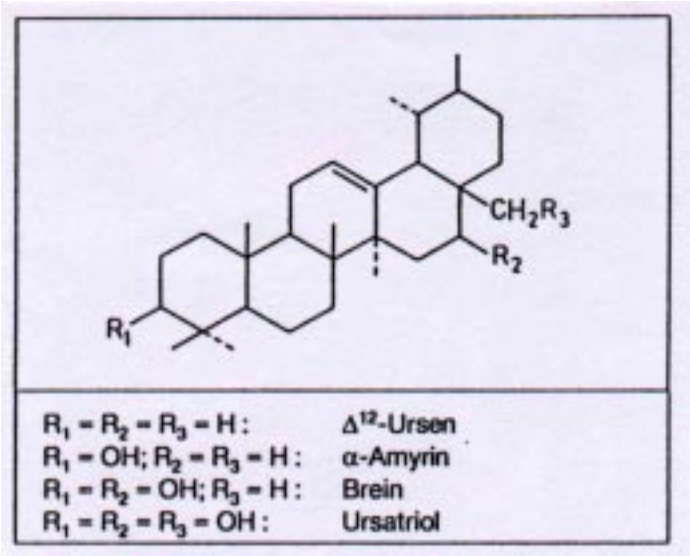


Abbildung 11: Triterpenalkohole mit Ursenstruktur

3.4.3. Sterole

Sterole kommen in allen Teilen der Ringelblume als freie Alkohole, Ester und Glykoside vor [72-76]. Sie sind mit Palmitin-, Myristin-, Laurin-, Stearin-, Öl- oder Linolsäure verestert [77,67]. An freien Sterolen wurden aus den Blüten Stigmasterol, Sitosterol, Campesterol und Cholesterol isoliert [77] sowie 28-Isofucosterol [78], 24-Methylencholesterol [79], Stigmastan-3ß-ol, Stigmast-7-en-3ß-ol, Ergost-7-en-3ß-ol [80], Citrostadienol (=α_1-Sitosterol) und sein Isomer 4α-Methylstigma-7-Z-(24,28)-dien-3ß-ol und 24-Methyleniophenol [81].

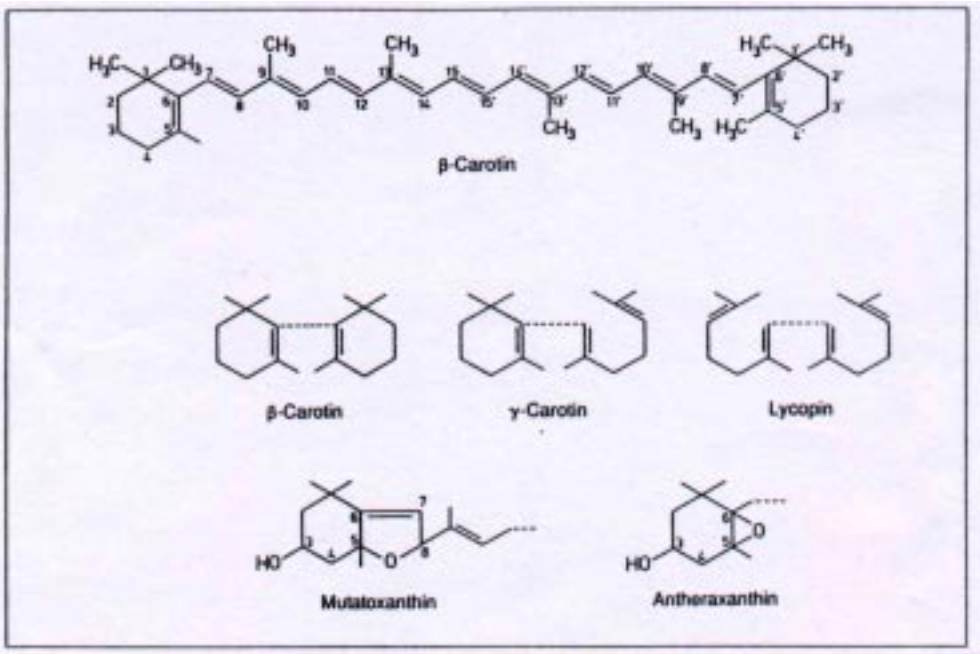
3.4.4. Mono- und Sesquiterpene

Das ätherische Öl der frischen Ringelblumenblüten ist reich an Monoterpen-Kohlenwasserstoffen, während bei getrockneten Blüten die Sesquiterpene überwiegen. Insgesamt sind etwa 45 Verbindungen identifiziert worden, darunter α-Cadinol, T-Cadinol, α-Thujen, α-Pinen, δ-Cadinen, p-Cymen, Trepinen-4-ol und Linalool [82,83].

3.4.5. Carotinoide

Carotine und Xanthophylle, die sauerstoffhaltigen Derivate der Carotine, zählen als C_{40}-Verbindungen zu den Tetraterpenen. Gesamtgehalt und Zusammensatzung der Carotinoide variiert mit der Farbe der Zungenblüten. Die orangefarbenen Varietäten zeichnen sich durch ihren Gehalt an Carotinen aus, in den gelb blühenden sind vorwiegend Xanthophylle enthalten. Der höchste in der Literatur angegebene Gesamtcarotinoidgehalt liegt bei 3 % [84-86].

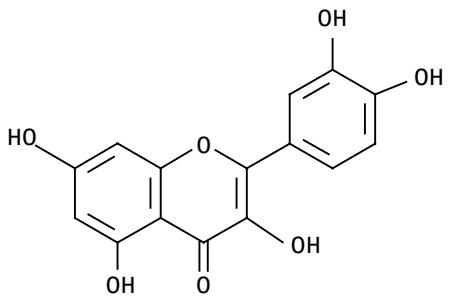
Abbildung 12: Carotinoide aus *Calendula officinalis*



3.4.6. Flavone und Flavonoide

An nichtterpenoiden Verbindungen aus der Ringelblume sind vor allem die im Pflanzenreich weit verbreiteten Flavonoide zu nennen. Die Blüten enthalten Flavonolglykoside mit Isorhamnetin oder Quercetin als Aglykon sowie Isorhamnetin und Kämpferol als freie Flavonole [87-91].

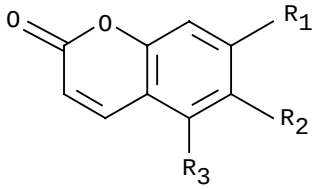
Abbildung 13: Isorhamnetin



3.4.7. Cumarine

Scopoletin, Aesculetin und Umbelliferon wurden nachgewiesen [92,93].

Abbildung 14: Cumarine



Name	R_1	R_2	R_3
Umbelliferon	H	OH	H
Aesculetin	OH	OH	H
Scopoletin	OH	OCH_3	H

3.4.7. Carbonsäuren

Aus den Infloreszenzen der Ringelblume wurde bisher eine Reihe von Carbonsäuren isoliert, dabei handelt es sich hauptsächlich um Phenolcarbonsäuren und Hydroxyzimtsäuren [94,95]:

Tabelle 2: Phenolcarbonsäuren aus *Calendula officinalis* L.

p-Hydroxybenzoesäure	Zimtsäure
Salicylsäure	o-und p-Cumarsäure
o-Hydroxyphenylessigsäure	Ferulasäure
Gentisinsäure	Kaffeesäure
Protocatechusäure	Chlorogensäure
Vanillinsäure	Sinapinsäure
Syringasäure	Veratrumsäure

An nichtphenolischen Säuren sind nur Chinasäure, Apfelsäure [53] und Bernsteinsäure [96] bekannt.

3.4.8. Polysaccharide

Neben Pektinen und Hemizellulose sind wasserlösliche Polysaccharide enthalten, welche aus Arabinose, Rhamnose und Galactose aufgebaut sind und ein mittleres Molgewicht zwischen 15 000 und 35 000 besitzen [97,98].

3.4.9. Paraffine

In den Blütenblättern von *Calendula officinalis* wurden gaschromatographisch 18 n-Paraffine von C_{18} bis C_{35} nachgewiesen [99]. Interessant ist, daß das Verhältnis von geraden zu ungeraden Paraffinen 6,5 zu 93,5 beträgt.

3.4.10. Vitamine

Der Gehalt an Vitamin C wird mit 0,133-0,310 % angegeben [100]. Außerdem werden α-, γ- und δ-Tocopherole beschrieben [101].

3.4.11. N-haltige Verbindungen

Mit Ausnahme von Betain [96] und Allantoin [50] sind aus *Calendula officinalis* keine N-haltigen Verbindungen bekannt. Allantoin entsteht beim Purin-Abbau und dient bei manchen Pflanzen als Speicher- und Transportsubstanz.

3.5. Pharmakologie und Toxikologie

3.5.1. Pharmakologische Wirkungen

Parallel zur Isolierung und Identifizierung der Inhaltsstoffe wurden in den letzten Jahrzehnten auch Untersuchungen zur Aufklärung pharmakologischer Wirkungen und Wirkprinzipien durchgeführt.

Seit Beginn der sechziger Jahre wird die **antimikrobielle** Wirkung untersucht, wobei *in vitro* antibakterielle Wirkungen u.a. gegen Staphylokokken, Streptokokken und

Escherichia coli-Bakterien sowohl mit wäßrigen als auch mit ethanolischen Auszügen in Verbindung gebracht werden [102]. Für insgesamt zwölf verschiedene Terpenderivate aus dem etherischen Öl wurde eine trichomonazide Wirkung nachgewiesen [103].

Anhand verschiedener Entzündungsmodelle (u.a. Crotonöltest am Mäuseohr, Pfotenödem-Test) konnte eine **antiinflammatorische** Wirkung von Calendulaextrakten nachgewiesen werden, für die Triterpendiolester verantwortlich gemacht werden konnten [104,105]. Ein positiver Einfluß auf die Regenerationsfähigkeit geschädigter Haut wurde in einer Tierversuchsstudie nachgewiesen. Die Wirkung wird auf eine durch den Pflanzenextrakt induzierte erhöhte Phagozytose und Makrophagendifferenzierung zurückgeführt [106].

Eine erhöhte Phagozytoseaktivität der Granulozyten bewirkt auch die **immunstimulierende** Wirkung, welche *in vitro* für Polysaccharidfraktionen beschrieben wird [97].

Die verbreiteteste aktuelle therapeutische Anwendung ist die Behandlung von Wunden, auch mit schlechter Heilungstendenz [107]. Über die für die **Wundheilung** durch Ringelblumen-Zubereitungen verantwortlichen Wirkstoffe gibt es derzeit allerdings noch keine gesicherten Erkenntnisse. Man vermutet das granulationsfördernde Prinzip in den Carotinoiden, da man von Verbindungen mit mehreren Doppelbindungen, z.B. auch dem Vitamin A granulationsfördernde Eigenschaften kennt [108]. Andererseits ist es aber bisher nicht gelungen, den Einfluß von Carotinoidfraktionen aus der Ringelblume auf den Wundheilungsprozeß experimentell nachzuweisen [109,110]. Nach anderer Meinung sind die wundheilenden und entzündungshemmenden Eigenschaften dem ätherischen Öl, den Xanthophyllen [111] bzw. den Flavonglykosiden zuzuschreiben [112]. Nicht zuletzt werden für die Wirkung die reichlich vorhandenen Oleanolsäureglykoside verantwortlich gemacht [113].

Für Saponine aus *Calendula officinalis*, *C. arvensis* und *Hedera helix* (Efeu) wurde eine **antimutagene** Wirkung nachgewiesen [114]. Eine ganze Reihe weiterer Wirkungen wie **antitumorale**, **parasympathomimetische**, **estrogene** oder **lipidsenkende** Effekte werden in der Literatur beschrieben [53].

Erst kürzlich veröfffentlichte Forschungsergebnisse belegen eine **anti-HIV-Aktivität** eines Ringelblumenblütenextraktes [115].

3.5.2. Toxikologie

Für alkoholische bzw. wäßrige Calendulaextrakte wurde bisher weder eine akute noch eine chronische Toxizität festgestellt [53]. Auch die im Rahmen der *in vivo*-Tests zu dieser Arbeit ermittelten LD_{50}-Werte bestätigen das.

4. *Scorzonera hispanica* L.

4.1. Vorkommen, Systematik, Botanik

Ihren Namen hat die Schwarzwurzel durch die schwarzbraune Korkschicht erhalten, die als Rinde dient (ital.: scorza=schwarz, nera=Rinde). Auch die Herleitung des Namens aus dem katalanischen Wort escurzo, was Schlange bedeutet, wird vermutet [129]. Die aus Südeuropa stammende Schwarzwurzel ist eine ausdauernde, mehrjährige Wiesenpflanze mit gelben Blütenkörbchen. Sie wurde offenbar erst in der Neuzeit in Kultur genommen, da in den Kräuterbüchern des 16.Jahrhunderts nur ihre Wildform erwähnt wird. In Südeuropa ist sie auch heute noch wild anzutreffen. Ihre fleischige Hauptwurzel (siehe Abbildung 15) weicht mit ihrer fast zylindrischen Gestalt von der typischen Rübenform ab. Die bis zu 30 cm lange und 1-2 cm dicke Wurzel verjüngt sich an der Spitze. Ihr weißliches Fleisch birgt zahlreiche Milchröhren, die einen gelblich-weißen, kautschukhaltigen, die Haut bräunenden Milchsaft ausscheiden [116,117].

Abbildung 15: *Scorzonera hispanica* L. [nach 118]

Außer der als Garten-Schwarzwurzel bezeichneten *Scorzonera hispanica* L. sind weitere 24 Arten beschrieben, z. B. *S. purpurea* L. (Rote Schwarzwurzel), *S. austriaca* (Österreichische Schwarzwurzel) und *S. humilis* (Niedere Schwarzwurzel).

Die systematische Einordnung der Schwarzwurzel ist folgende [50]:

Abteilung:	Spermatophyta (Samenpflanzen)
Unterabteilung:	Angiospermae (= Magnoliphytina, Bedecktsamer)
Klasse:	Dicotyledoneae (= Magnoliopsida, Zweikeimblättrige Bedecktsamer)
Unterklasse	Asteridae
Überordnung:	Asteranae
Ordnung	Asterales
Familie:	Asteraceae (= Compositae, Korbblütler)
Unterfamilie:	Lactuceae
Gattung:	Scorzonera
Art:	*Scorzonera hispanica*

4.2. Inhaltsstoffe der unterirdischen Pflanzenteile

4.2.1. Triterpene

Aus der Garten-Schwarzwurzel *Scorzonera hispanica* ist bisher nur Oleanolsäure isoliert worden [119]. Dagagen wurden aus den oberirdischen Pflanzenteilen von *Scorzonera tomentosa*, die in der Türkei beheimatet ist, auch die Triterpenmonole Lupeol und α-Amyrin beschrieben [120].

4.2.2. Sterole

Als Hauptkomponente der Sterolfraktion wurde ß-Sitosterin identifiziert, welches sowohl frei als auch glycosidisch gebunden als ß-Sitosterol-ß-D-glucopyranosid vorkommt. Außerdem wurden Stigmasterol und Campesterol [119] sowie Taraxasterol [121] als freie Sterole isoliert .

4.2.3. Flavonverbindungen

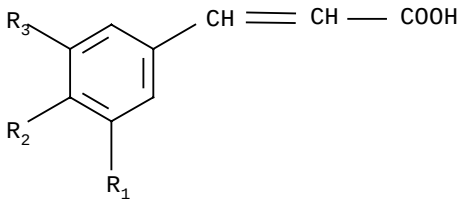
Aus *Scorzonera hispanica* sind bisher keine Flavonole oder -glycoside bekannt. Aus *S. columnae*, einer in der Appenninenregion verbreiteten Art, wurden Quercetin (3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavon) frei und als Glucosid (Quercetin-3-6-caffeolyl-galactosid), Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon) und Luteolin (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon) isoliert [122].

4.2.4. Carbonsäuren

Die in der Schwarzwurzel vorkommenden Säuren, hauptsächlich die Hydroxyzimtsäuren, wurden von Herrmann et al. sehr umfangreich beschrieben [123-126].

Während freie Hydroxyzimtsäuren in der Natur nur selten vorkommen, stellen ihre Verbindungen einen sehr variationsreichen Bestandteil phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe dar. Den überwiegenden Anteil dieser Derivate bilden ihre Ester mit Chinasäure, deren bekannteste Verbindung die Chlorogensäure (3-O-Kaffeolylchinasäure) darstellt:

Abbildung 16: Hydroxyzimtsäuren



Trivialname	R_1	R_2	R_3
4-Cumarsäure	H	OH	H
Ferulasäure	OCH_3	OH	H
Kaffeesäure	OH	OH	H
Sinapinsäure	OCH_3	OH	OCH_3

Hydroxyzimtsäurederivate stellen im biochemischen Ablauf der Pflanzen Vorläufer bei der Biosynthese sekundärer phenolischer Pflanzeninhaltstoffe wie Flavonole, Anthocyanidine oder Cumarine dar. Außerdem wurde *in vitro* nachgewiesen, daß Hydroxyzimtsäuren, besonders Kaffeesäure, die Carotinoide vor Oxidation schützen [127].

Folgende organische Säuren bzw. Derivate sind aus der Schwarzwurzel bekannt:

Tabelle 3: Carbonsäuren aus *Scorzonera hispanica* L.

Äpfelsäure	Malonsäure (in Spuren)
Chinasäure	Vanillinsäure
p-Cumarsäure	Gentisinsäure
Kaffeesäure	Chlorogensäure
Ferulasäure	Citronensäure
Isocitronensäure	Aconitsäure
Weinsäure	

4.2.5. Cumarine

Es wurden die beiden Hydroxycumarine Scopoletin und Esculetin isoliert [125,126].

4.2.6. Carotinoide

Der Carotingehalt wird mit 0,02 mg bezogen auf 100g eßbaren Anteil angegeben [117].

4.2.7. Weitere Inhaltsstoffe

Der eßbare Anteil von verschiedenen Gemüsesorten wurde auf den Gehalt und die Zusammensetzung der **Fettsäuren** untersucht. In der Schwarzwurzel wurden Linolensäure und Ölsäure nachgewiesen [128].

Trigonellin (Nicotinsäuremethylbetain) wird bei Karrer [121] als Inhaltsstoff der Schwarzwurzel beschrieben, ebenfalls **Coniferin** (Coniferol-O-ß-D-Glu), ein Zimtalkoholglycosid.

An **Vitaminen** werden die Vitamine B_1, B_2 und C erwähnt sowie Nicotinamid, ein Vitamin des B_2-Komplexes [117].

Erwähnenswert ist der hohe Gehalt an Eiweiß und Kohlenhydraten (12-16 %), hauptsächlich bestehend aus **Zucker**, **Zellulose** und **Inulin**, dem typischen Speicherstoff der Korbblütler [116].

4.3. Pharmakologie und Toxikologie

Für spezielle pharmakologische Wirkungen ist die Schwarzwurzel nicht bekannt. In der Literatur findet man vereinzelte Überlieferungen über so verschiedene Wirkungen wie analgetische und anthelmintische für *S. tomentosa* [120] oder des Einsatzes bei Diabetes und Magen-Darm-Erkrankungen [118].

Ein Bericht über die Verwendung der Schwarzwurzel gegen Schlangenbisse [129] gab den Ausschlag für die Einbeziehung der Pflanze in die vorliegenden Untersuchungen.

Über toxische Wirkungen ist in Anbetracht der Nutzung als Lebensmittel nichts bekannt.

5. Grüner Tee (*Camellia sinensis*)

5.1. Vorkommen, Systematik, Botanik

Zu grünem Tee verarbeitet man die getrockneten, aber im Gegensatz zu Schwarz-Tee unfermentierten Blätter des immergrünen Teestrauches *Camellia sinensis*. Der Teestrauch ist mit der Kamelie sehr nahe verwandt, wie aus dem botanischen Gattungsnamen hervorgeht.

Seine Heimat sind die Berghänge der chinesischen Provinz Yünnan und die immergrünen Wälder der Vorgebirge des Himalaya in Burma und Assam. Dort kommt die Pflanze im Waldunterwuchs bis 2000 m Höhe wild vor. Kultur und Genuß des Tees sind in China bereits aus der Zeit von 2700 v. Chr. schriftlich belegt. Nach Europa gelangte der Tee um 1550 durch die Araber. Heute wird Tee außer in Asien auch in Ostafrika, Argentinien und der Türkei angebaut [130].

20 kg Pflückgut ergeben 4-6 kg Trockentee. Das geerntete Material wird zuerst in Welkhäusern in belüfteten Trögen angetrocknet. Dabei sinkt der Wassergehalt von

75 % auf 30-40 %. Die weichen biegsamen Blätter werden maschinell gerollt, dabei werden die Zellwände der Blätter aufgebrochen, der Zellsaft kommt mit dem Luftsauerstoff in Berührung. Durch die Oxidation entstehen die ätherischen Öle, die für das typische Aroma des Tees verantwortlich sind. Bei der Herstellung von grünem Tee wird, wie bereits erwähnt, an dieser Stelle nicht fermentiert, sondern nur stark erhitzt (um die Enzyme zu zerstören) und anschließend wird das Material in heißer Luft bei 80-110°C zur Haltbarmachung getrocknet [131].

Die systematische Einordnung des Teestrauches unterscheidet sich von den davor beschriebenen Pflanzen *Calendula officinalis* und *Scorzonera hispanica*. Zwar gehört der Teestrauch ebenfalls in die Unterklasse Asteridae, die weitere Einordnung ist jedoch folgende:

Überordnung:	Theanae
Ordnung:	Theales
Familie:	Theaceae
Gattung:	Thea (auch: Camellia)

Der botanische Name der Teepflanze hat im Laufe der Zeit mehrmals gewechselt. Heute wird in der Systematik einheitlich die Bezeichnung *Camellia sinensis* (L.) Kuntze verwendet [132]. Über die Vielzahl der Varietäten gibt es jedoch noch zahlreiche unterschiedliche Auffassungen. Folgende Einteilung hat größere Verbreitung gefunden:

1. China-Tee (C. sinensis var. sinensis)
Dieser ist verhältnismäßig widerstandsfähig gegenüber Trockenheit und Frost, erreicht eine Höhe bis zu 8 m und neigt zu frühzeitiger starker Blütenbildung. Die Blätter weisen eine Länge bis zu 9 cm auf.

2. Assam-Tee (C. sinensis var. assamica)
Assam-Tee ist schnellwüchsiger und erreicht eine Höhe von 10-15 m. Seine Blätter werden bis zu 12 cm lang, sind weicher und laufen in einer deutlichen Blattspitze aus.

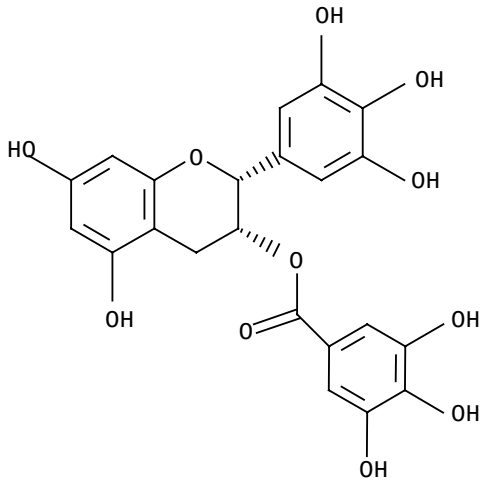
5.2. Inhaltsstoffe der Teeblätter

- **Methylxanthine:** Coffein, geringe Mengen Theophyllin und Theobromin. Der Coffeingehalt liegt mit 2,7-3,3 % [130] deutlich höher als der von Kaffee. Ein Großteil des Coffeins ist jedoch an Gerbstoffe gebunden.
- **Polyphenole**: Polyphenol-Gerbstoffe, vor allem Gallussäureester von Proanthocyanidinen. Hauptbestandteil: Galloyl-(-)-epigallocatechin [133], dessen Grundkörper das Catechin, ein 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavan-3-ol, ist.
- **Flavonolglycoside** von Quercetin, Kämpferol und Myricetin [134],
- **Carbonsäuren**: Phenolcarbonsäuren wie Gallussäure und Chlorogensäure sowie viel Oxalsäure und andere Fruchtsäuren [133],
- **Carotinoide** [135],
- **Triterpensaponine** [136],
- **Lipoxigenase- Hemmstoffe** [137].

5.3. Pharmakologie und Toxikologie

Tee galt in Europa zunächst als Arzneimittel. Man trank ihn gegen Bronchitis und Erkältungen. Ludwig XIV. ließ sich mit Tee gegen Gicht behandeln [138]. Heute zählt Tee wegen seines Coffeingehaltes und der damit verbundenen **anregenden** Wirkung als Genußmittel und nicht mehr als Arzneimittel. Gerbstoffe wirken **adstringierend, antidiarrhoisch** und **antibakteriell**. Die Catechine werden für die **antimutagene/antioxidative** Wirkung verantwortlich gemacht [139,140], auch wird eine **anticarzinogene** Wirkung diskutiert [141]. Es wurde experimentell nach-gewiesen, daß Epigallocatechin-3-gallat das proteolytische Enzym Urokinase blockiert, welches u. a. für die Metastasenbildung von Krebszellen verantwortlich ist.

Abbildung 17: Epigallocatechin-3-gallat



Bezüglich der Toxizität von Teeblättern wird die Behauptung diskutiert, ob gerbstoffhaltige Getränke das Auftreten von Speiseröhrenkrebs fördern [136]. Darüberhinaus ist die Belastung von Tee mit Organochlorpestiziden von sekundärer Natur.

C Isolierung und Untersuchung der Pflanzeninhaltsstoffe

1. Das Pflanzenmaterial

1.1. *Calendula officinalis* L.

Es wurden Extrakte sowohl der Blüten (flores) als auch der gesamten oberirdischen Pflanzenteile (herba) hergestellt. Das Pflanzenmaterial wurde von der Fa. Galke (Gittelde/Harz) bezogen.

1.2. *Scorzonera hispanica* L.

Es wurden Extrakte aus den oberirdischen (herba) und den unterirdischen (radix) Pflanzenteilen der Schwarzwurzel hergestellt. Die oberirdischen Teile (nur Blätter) stellte das Bundessortenamt in Rethmar zur Verfügung. Die Wurzeln stammen von der Fa. Van Rijn, s'Grave (Holland) und wurden über den Wochenmarkt in Hannover bezogen.

1.3. Grüner Tee

Es wurde ein Extrakt aus getrockneten Teeblättern der Fa. Teekanne GmbH, Düsseldorf, hergestellt. Die Blätter des Teestrauches *Camellia sinensis* waren unfermentiert, d. h. zu grünem Tee verarbeitet.

2. Herstellung der Rohextrakte

Die Rohextrakte aller drei Pflanzen wurden auf gleiche Weise hergestellt.

Das Pflanzenmaterial sollte auf schonende Weise extrahiert werden, um möglichst das gesamte Inhaltsstoffspektrum der Pflanze zu erhalten. Die Mazeration wurde als Extraktionsverfahren gegenüber der Extraktion am Rückfluß und dem Soxhlet-Verfahren bevorzugt, um die durch die erhöhten Temperaturen beschleunigt ablaufenden Prozesse wie Oxidation, Glykosidspaltung oder Verseifung zu vermeiden.

Das zerkleinerte und getrocknete Pflanzenmaterial wurde in dunklen 2,5 l-Flaschen mit destilliertem Isopropanol sieben Tage bei Raumtemperatur mazeriert. Anschließend wurde filtriert und das Lösungsmittel bei 40°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer entfernt.

Die erhaltenen Rohextrakte waren im Fall von *Calendula officinalis* herba, des Grünen Tees und von *Scorzonera hispanica* herba aufgrund des Chlorophyllgehaltes dunkelgrün sowie von fester bis zähflüssiger Konsistenz. Der Rohextrakt von *Calendula officinalis* flores zeigte eine orange bis bräunliche Färbung und ebenfalls feste bis zähflüssige Konsistenz. Der Extrakt der Wurzeln von *Scorzonera hispanica* war honigfarben und von klebrig-zäher Konsistenz.

3. Chromatographische Auftrennung

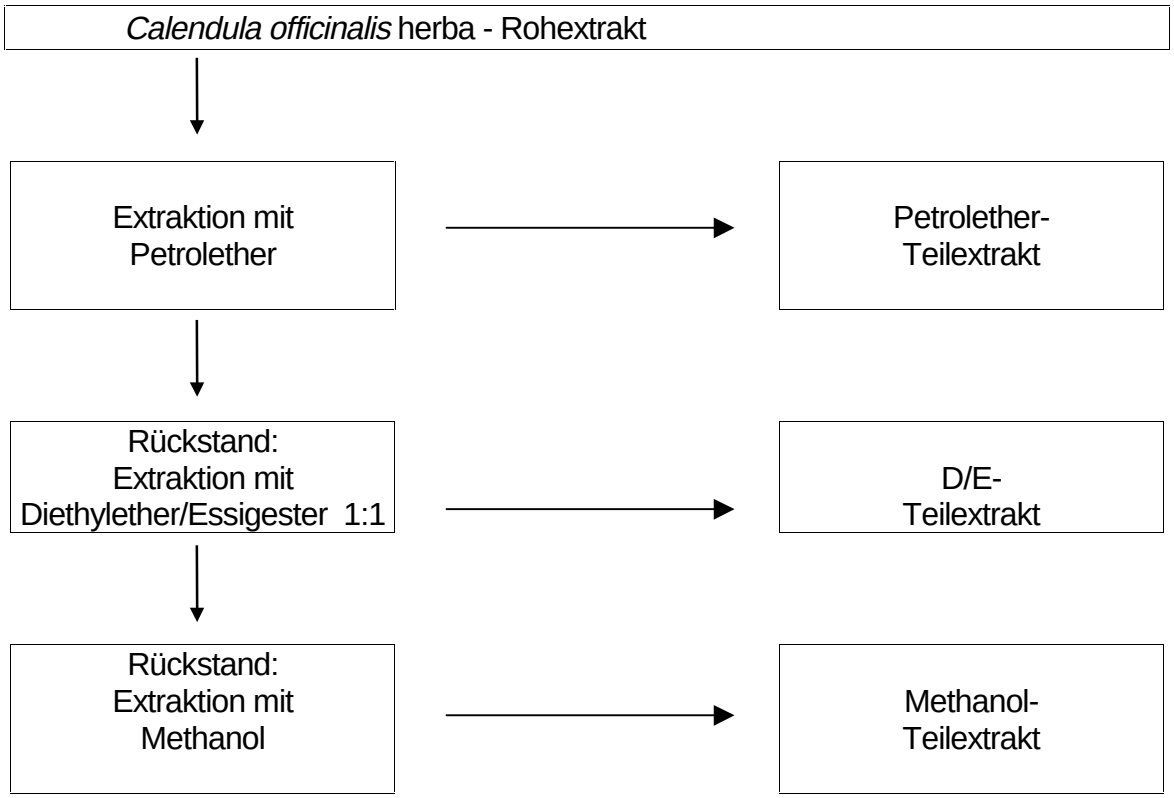
3.1. *Calendula officinalis* L.

3.1.1. Auftrennung in Teilextrakte und Fraktionierung

Die zunächst vorgenommene Auftrennung der Extrakte in einen unpolaren, mittel-polaren und polaren Teilextrakt (siehe folgendes Schema) erfolgte mit dem Ziel, die antihämorrhagische Aktivität der Pflanze einem bestimmten Polaritätsspektrum zuzuordnen, um gezielt in diesem Teil des Extraktes die wirksame(n) Substanz(en) suchen zu können.

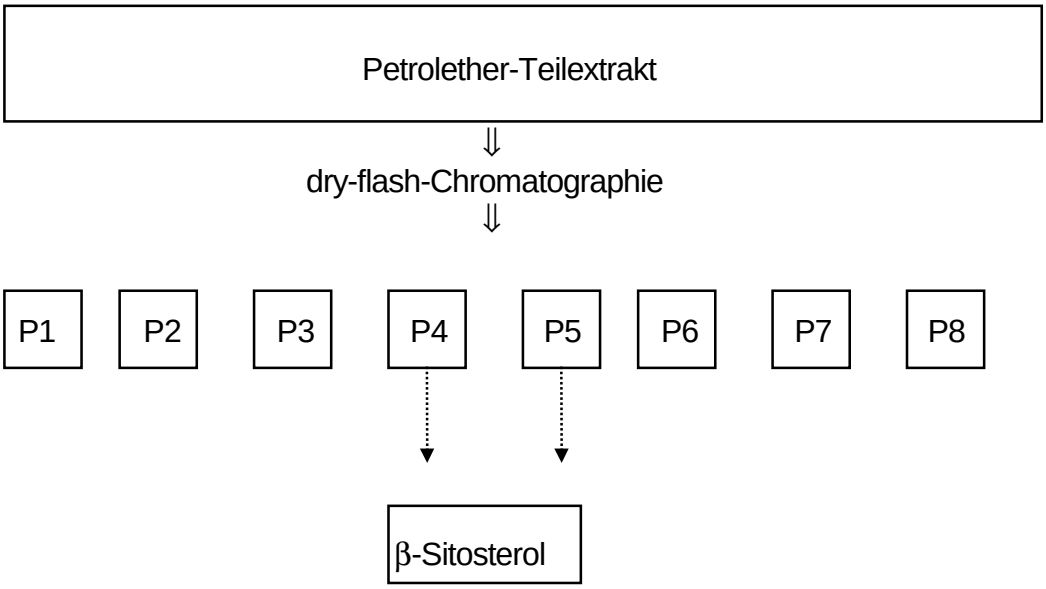
Zur weiteren Fraktionierung der einzelnen Teilextrakte wurden dry-flash- und Säulenchromatographie benutzt. Da es erforderlich war, größere Mengen an Reinsubstanz zu isolieren (für die Strukturaufklärung sowie für biologische Tests werden jeweils mind. 5 mg benötigt), konnten an dieser Stelle nur Methoden zum Einsatz kommen, die eine hinreichend große Menge an Rohextrakt trennen. Deshalb bot sich für die Reinigung und Trennung der nach der Mazeration angefallenen Rohextrakte das Standardverfahren der Säulenchromatographie an. Bei der Prüfung verschiedener Sorbentien wurden die besten Auftrennungsergebnisse mit Kieselgel erreicht. Deshalb kam die Chromatographie an Kieselgel zumindest im unpolaren Bereich als erster Schritt zum Einsatz. Da phenolische Verbindungen relativ leicht an Kieselgel adsorbieren, bot sich für die Trennung dieser Verbindungen die Gelchromatographie mit Sephadex LH_{20} an.

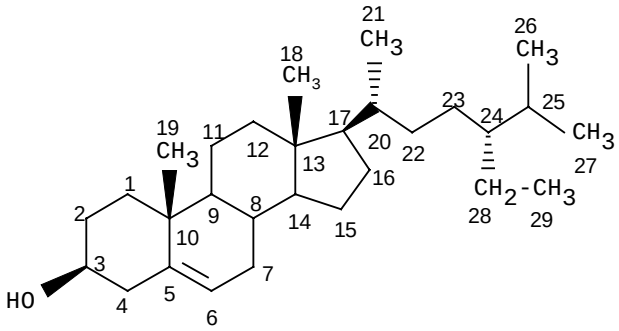
Zunächst wurde mit der dry-flash-Chromatographie getrennt [142]. Diese Methode ermöglicht es, durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuums größere Substanzmengen mit verhältnismäßig geringem Zeitaufwand zu trennen. Während der biologischen Tests mit damit gewonnenen Fraktionen stellte sich jedoch heraus, daß die antihämorrhagische Aktivität nach dieser Trennung nicht mehr nachzuweisen war. Deshalb wurde für die weitere Fraktionierung auf diese Methode verzichtet, da sie offenbar zuviel Substanzverlust mit sich bringt.



3.1.2. Isolierung und Identifizierung von β-Sitosterol 1

Der Petrolether-Teilextrakt wurde durch dry-flash-Chromatographie aufgetrennt. Die Trennung erfolgte mittels eines Lösungsmittelgradienten Petrolether → Essigester. Begonnen wurde die Elution mit 100 % Petrolether, danach wurde in 5 % - Schritten zunehmend mit Essigester versetzt. Es wurden zunächst 212 Fraktionen zu je 50 ml aufgefangen, die nach dünnschicht-chromatographischer Untersuchung zu acht Fraktionen vereinigt wurden:





Aus den Fraktionen P4 und P5 fiel β-Sitosterol in Form von farblosen, ca. 5 mm langen nadelförmigen Kristallen aus. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung ergab folgende Ergebnisse:

FM: 1
Rf-Wert: 0,25
Detektion: -UV 254: keine Floureszenzlöschung
-UV 366: keine Eigenfluoreszenz
-Sprühreagenz 1: rosa Färbung
-Sprühreagenz 2: rosa Färbung

Dünnschichtchromatographische Vergleichsuntersuchungen mit verschiedenen Sterolen (Sitosterol, Stigmasterol, Cholesterol) zeigte gute Übereinstimmung, jedoch

konnte aufgrund der ähnlichen Rf-Werte keine eindeutige Aussage getroffen werden. Deshalb sollte die NMR-Spektroskopie eine Identifizierung ermöglichen.

Tabelle 4: ^{1}H-chemische Verschiebungen von β-Sitosterol 1

Proton(en) an C-Atom	Signal/ Integral	β-Sitosterol 1 δ [ppm]	Literatur [143] δ [ppm]
3	m 1H	3,52	3,50
6	dd 1H	5,35	5,38
18	s 3H	0,67	0,70
19	s 3H	0.99	1,00
21	d 3H	0,91	0,95
26	d 3H	0,82	0,78
27	d 3H	0,80	0,75
29	t 3H	0,83	0,90

Das Protonenspektrum weist im hohen Feld sechs Signalgruppen auf, die durch die Methylgruppen hervorgerufen werden. Die Singuletts bei 0,67 ppm und 0,99 ppm entsprechen jeweils den Protonen an C-18 bzw. C-19. Weiterhin gehören die drei Dubletts bei 0,91 ppm, 0,82 ppm und 0,80 ppm zu den Protonen an C-21 (Kopplung mit Proton an C-20), an C-26 (Kopplung mit Proton an C-25) und an C-27 (Kopplung wie 26). Das verbleibende Triplett bei 0,83 ppm muß den Protonen an C-29 zugeordnet werden. Das Signal der Methylgruppe C-19 absorbiert bei tieferem Feld als die Protonen an C-18, weil diese durch die Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 eine Entschirmung erfahren. Die Methylgruppe an C-26 wird im Gegensatz zur Methylgruppe an C-27 durch die Ethylgruppe an C-24 weniger stark abgeschirmt und erscheint deshalb bei tieferem Feld. Das für β-Sitosterol charakteristische Methinproton an C-6 tritt bei tiefstem Feld (5,35 ppm) als Doppeldublett durch die Kopplung zu den α-und β-ständigen Protonen an C-7 in Resonanz. Das breite Multiplett bei 3,52 ppm wird durch das α-ständige Proton an C-3 verursacht. Aus den ^{1}H-NMR-Daten geht damit eindeutig hervor, daß es sich bei der aus den Fraktionen P4 und P5 isolierten Verbindung 1 um ein Sterolderivat handelt.

Tabelle 5: ^{13}C-chemische Verschiebungen von β-Sitosterol 1

C-Atom	ß.Sitosterol δ [ppm]	Literatur [144] δ [ppm]
1	37,24 t	37,50 t
2	31,66 t	32,17 t
3	71,80 d	71,90 d
4	42,30 t	42,54 t
5	140,75 s	141,01 s
6	121,68 d	121,70 d
7	31,89 t	32,08 t
8	31,89 d	31,89 d
9	50,12 d	50,48 d
10	36,49 s	36,70 s
11	21,07 t	21,28 t
12	39,76 t	40,05 t
13	42,30 s	42,54 s
14	56,76 d	56,53 d
15	24,29 t	24,43 t
16	28,23 t	28,32 t
17	56,04 d	57,02 d
18	11,85 q	12,08 q
19	19,39 q	19,84 q
20	36,13 d	36,28 d
21	18,77 q	18,93 q
22	33,93 t	34,26 t

Fortsetzung der Tabelle 5:

C-Atom	β-Sitosterol δ [ppm]	Literatur [144] δ [ppm]
23	26,05 t	26,66 t
24	45,82 d	46,20 d
25	29,13 d	29,59 d
26	19,81 q	19,46 q
27	19,02 q	19,24 q
28	23,05 t	23,37 t
29	11,97 q	11,98 q

Das ^{13}C-NMR-Spektrum weist 27 Signale auf (Abbildung 34 und Tabelle 5). Dabei zeigen die C-Atome 7 und 8 sowie 4 und 13 gleiche chemische Verschiebungen (zufällige Isochronie). Aus der Lage der Signale von C-7 und C-12 läßt sich ablesen, daß die Ringe B/C und C/D des Androstan-Grundgerüstes trans-verknüpft sind. Die Substituenten an C-3, C-10, C-13 und C-17 sind β-ständig. Die Signale bei 140,75 ppm (s), bei 121,68 ppm (d) sowie das Signal der Methylgruppe an C-19 (19,39 ppm) bestätigen die Lage der Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 in Übereinstimmung mit den ^{1}H-NMR-Daten.

Aus dem Massenspektrum (Abbildung 35) geht der [M+1]-Peak mit der Massenzahl 415 hervor, was der Summenformel von β-Sitosterol, $C_{29}H_{50}O$ entspricht.

Durch die spektroskopischen Untersuchungen wurde die Substanz eindeutig als β-Sitosterol (24-Ethyl-cholest-5-en-3-ol, Stigmast-5-en-3-ol) identifiziert.

3.1.3. Isolierung und Identifizierung von Sitosterol-3-O-β-D-glucosid 2

Der Diethylether/Essigester-Teilextrakt wurde durch dry-flash-Chromato-graphie in neun Teilextrakte DE 1 bis DE 9 aufgetrennt. Die Verbindung 2 fiel beim Einengen der Fraktionen DE 5 bis 8 aus dem Diethylether/Essigester-Teilextrakt als weißer Niederschlag aus. Durch Waschen mit Methanol und Chloroform erhält man eine reine weiße, pulverförmige Substanz. Die dünnschichtchromatographische Detektion ergibt die gleichen Farbreaktionen wie β-Sitosterol 1. Da aber die Verbindung 2 wesentlich polarer ist (Rf-Wert 0,85 in Fließmittel 7), liegt entweder ein Glykosid oder eine andere Verbindung mit gleichem Grundgerüst, aber mit einem weiteren polaren Substituenten vor.
Aufgrund der Unlöslichkeit in Chloroform und Methanol wurden die NMR-Spektren in Pyridin-d_5 vermessen. Durch das aromatische Lösungsmittel wird der ASIS-Effekt (aromatic solvent induced shift) wirksam, d.h. die Resonanzsignale der in aromatischen Solventien gelösten Substanzen liegen in höherem Feld als in aliphatischen Lösungsmitteln. Dieser Effekt wird dem Ringstrom des Benzols und seiner Derivate zugeschrieben [145]. Aus diesem Grund können die Spektren von β-Sitosterol und der Verbindung 2 nicht direkt miteinander verglichen werden, sondern es wird hier das Spektrum von Cholesterolglucosid [146], welches ebenfalls in Pyridin aufgenommen wurde, zum Vergleich herangezogen.

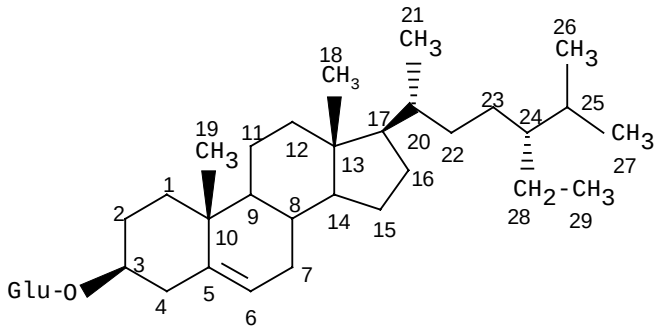
Das ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung 2 (siehe Tabelle 6 und Abbildung 36) weist 35 Signale auf und zeigt, daß die Doppelbindung wie in β-Sitosterol zwischen C-5 und C-6 liegt. Gegenüber Cholesterol ist das Signal an C-3 zu tieferem Feld verschoben; die Signale an C-4 und C-2 sind zu höherem Feld verschoben. Daraus geht hervor, daß über die OH-Gruppe an C-3 der Zucker gebunden ist.

Tabelle 6: ^{13}C-chemische Verschiebungen von 2

C-Atom	Sitosterol-3-O-β-D-glucosid 2 δ [ppm] / Signal		Cholesterolglucosid [146] δ [ppm]
1	38,87	t	37,8
2	30,39	t	30,4
3	78,22	d	78,7
4	39,66	t	39,6
5	140,74	s	141,4
6	121,71	d	121,7
7	31,49	t	32,4
8	31,88	d	32,4
9	50,11	d	50,8
10	36,74	s	37,2
11	21,30	t	21,5
12	39,78	t	40,3
13	42,30	s	42,8
14	56,75	d	57,2
15	25,52	t	24,6
16	28,36	t	28,4
17	56,66	d	56,9
18	11,99	q	12,1
19	19,24	q	19,5
20	36,21	d	36,0
21	19,05	q	19,1
22	37,30	t	36,7
23	24,34	t	24,3
24	40,01	d	39,9
25	29,13	d	28,2
26	21,30	q	22,7
27	19,81	q	22,8
28	22,66	t	
29	12,35	q	
1’	102,36	d	102,7
2’	75,09	d	75,2
3’	78,36	d	78,4
4’	71,47	d	72,1
5’	77,96	d	77,8
6’	62,62	t	63,2

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (siehe Abbildung 37) treten die Methylgruppen an C-18 und C-19 bei 0,62 ppm bzw. 0,90 ppm als Singuletts auf. Die Signale der Methylgruppen an C-21, C-26 und C-27 erscheinen als Dubletts bei 1,04 ppm, 0,86 ppm bzw. 0,85 ppm, die Methylgruppe an C-29 bei 0,94 ppm. Das Signal bei 3,94 ppm wird dem axial stehenden Proton an C-3 zugeordnet. Es erscheint gegenüber dem Protonenspektrum von β-Sitosterol (Tabelle 4) um 0,42 ppm zu tieferem Feld verschoben, verursacht durch die Glykosidierung, aber auch durch das Lösungsmittel. Ebenfalls eine lösungsmittelbedingte, geringe Tieffeldverschiebung erfährt das Methinproton an C-6 bei 5,30 ppm. Das anomere Proton (an C-1') erscheint als Dublett bei 5,02 ppm mit einer relativ großen Kopplungskonstanten, welche die trans-Stellung der Protonen an C-1' und C-2'und damit die β-Verknüpfung der Glucose bestätigt. Das Signal des Protons an C-2' erscheint bei 4,03 ppm. Das Multiplett bei 4,30 ppm mit einer Integrationsstufe für zwei Protonen wird H-3' und H-4' zugeordnet. Die Protonen an C-5' und C-6' bilden ein ABX-System. Der AB-Teil liegt bei 4,36 ppm und 4,52 ppm.

Damit bestätigen die ^{1}H-chemischen Verschiebungen ebenfalls das Vorliegen von β-Sitosterol und Glucose. Die Verbindung 2 wird somit als Sitosterol-3-O-β-D-glucosid identifiziert:



Das Vorhandensein einer Reihe weiterer Signale geringerer Intensität im ^{13}C-NMR-Spektrum deutet aufgrund der Lage dieser Signale darauf hin, daß die Substanz ein Gemisch mit einem chemisch ähnlichen Sterol darstellt, möglicherweise mit Stigmasterol. In der Vergangenheit wurden diese beiden Substanzen oft als Gemisch oder als Mischkristall isoliert [96].

3.1.4. Isolierung und Identifizierung des Sitosterolderivates 3

Ebenfalls aus Fraktionen des Diethylether/Essigester-Teilextraktes nach dry-flash-Chromatographie konnte die Verbindung 3 isoliert werden. Zunächst wurde die Fraktion DE 6, die sich *in vitro* als antihämorrhagisch aktiv erwies, einer Säulenchromatographie mit Kieselgel unterworfen und in sieben Teilfraktionen DE 61 bis DE 67 aufgetrennt. Die Fraktion DE 63 zeigte auf dem DC einen größeren Substanzfleck. Diese Substanz wurde mittels präparativer Dickschichtchromatographie isoliert. Es wurde nach einem weiteren Reinigungsschritt (Säulenchromatographie mit Sephadex LH_{20}) eine farblose filmartige Substanz erhalten, die in Methanol, Chloroform und Essigester löslich war. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung ergab folgendes Ergebnis:

FM:	3	4
Rf:	0,52	0,60

Detektion: -UV 254: keine Fluoreszenzlöschung
-UV 366: keine Eigenfluoreszenz
-Sprühreagenz 1: lila-brauner Substanzfleck

Aufgrund der Farbreaktion sollte die Verbindung 3 wiederum ein Sterolderivat sein, aufgrund der Rf-Werte und des Löslichkeitsverhaltens allerdings polarer als β-Sitosterol 1 und wiederum unpolarer als ein entsprechendes Glykosid wie 2.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung lieferte Signale für eine Zuckerkomponente, darüberhinaus aber eine Reihe von Signalen, die zu einem weiteren Substituenten gehören.

Zur Identifizierung des Aglykons wurde die Verbindung einer sauren Hydrolyse unterzogen. Die anschließende dünnschichtchromatographische Überprüfung ergab hinsichtlich des Rf-Wertes und der Farbreaktion des Aglykons Übereinstimmung mit β-Sitosterol, außerdem wurde eine weitere unpolare Komponente gefunden, die aufgrund der Farbreaktion (dc) kein Sterol ist, sowie eine Zuckerkomponente.

Zunächst wurde mittels FAB-MS (siehe Abbildung 38) die Molmasse der Verbindung mit 712 g/mol ermittelt. Das beweist, daß neben der Steroid- und einer Monosaccharidkomponente ein weiterer Substituent vorhanden sein muß. Aufgrund der schon erwähnten Polarität der Verbindung 3 muß dieser Substituent sehr unpolaren Charakter haben, eventuell eine langkettige Verbindung sein. Steroide verestert mit Fettsäuren sind aus verschiedenen Pflanzen isoliert worden und erhielten die Bezeichnung **Sitoindoside** [147,148].

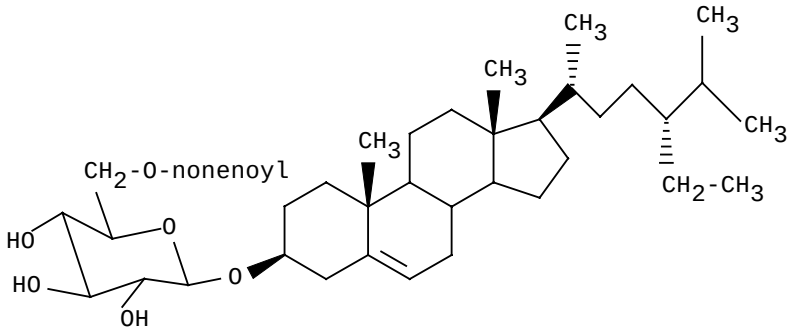
Das IR-Spektrum (Abbildung 39) zeigt eine Bande bei 1717 cm^{-1}, die als C=O-Valenzschwingung auf eine Esterfunktion hinweist. Zwischen 1100 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} sind außerdem zwei Banden infolge C-O-Valenzschwingungen zu erkennen.

Unter der Annahme, daß 3 aus Sitosterol, Glucose und einer Fettsäure zusammengesetzt ist, verbleibt aus der Molmasse von 712 g/mol nach Abzug von 396 g/mol (Aglykon minus Wasser) und 162 g/mol (Glucose minus Wasser) die Masse von 154 g/mol für die Säurekomponente, was einer Summenformel von $C_9H_{14}O_2$ und der zweifach ungesättigten C_9-Mono-carbonsäure Nonenylsäure entspricht.

Alle anderen Signale des IR-Spektrums können weniger zur weiteren Strukturaufklärung beitragen, da auch im Sterolgerüst eine Doppelbindung, für die man IR-Banden findet, vorhanden ist. Deshalb sollte eine NMR-spektroskopische Untersuchung Aufschluß über die Struktur bringen.

Die NMR-spektroskopischen Daten werden mit denen von Sitosterol-3-O-β-D-glucosid 2 verglichen, wobei zu beachten ist, daß die Spektren von 3 in MeOH

aufgenommen wurden (und nicht wie 2 in Pyridin) und deshalb chemische Verschiebungen aufgrund von Lösungsmitteleffekten keine vollständige Übereinstimmung der entsprechenden Signale erwarten lassen. Weiterhin wird das Spektrum von 6'-O-Palmitoyl-sitosterol-3-O-β-D-glucosid, welches aus der Brennessel *Urtica dioica* isoliert wurde, als Vergleich herangezogen [148]. Im ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung 3 (Abbildung 40) findet man erwartungsgemäß ein bei tiefstem Feld auftretendes Signal bei 167,43 ppm, welches zu dem in der Esterbindung vorliegenden Carbonylkohlenstoff gehört. Von den verbleibenden Signalen weisen 28 gute Übereinstimmung mit den Signalen von Sitosterol-3-O-β-D-glucosid auf (siehe Tabelle 7). C-3 weist den für das α-C-Atom erwarteten Glycosidierungseffekt von 5,5 ppm auf. Die weiteren Signale können der Säurekomponente zugeordnet werden. Insgesamt vier Signale für tertiäre C-Atome im Bereich von 115 ppm und 129 ppm bestätigen die zwei Doppelbindungen im Säurerest. Im Bereich um 30 ppm sind die Signale für die aliphatischen Methylengruppen von unverzweigten Verbindungen zu finden. Die C-Atome 1' bis 4' der Glucose treten in nahezu unveränderter Resonanzlage im Vergleich zu den für die Verbindung 2 ermittelten Werten auf. C-5' und C-6' erfahren die durch die Veresterung der Hydroxylgruppe an C-6' bedingten Verschiebungen.



(6'-O-Nonenoyl)-sitosterol-3-O-β-D-glucosid 3

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abbildung 41) erkennt man neben den charakteristischen Signalen der Methylgruppen im hohen Feld bei 2,20 ppm das Triplett der α-Methylengruppe der Carbonsäure und das breite Multiplett bei 1,15 ppm, welches durch die übrigen Methylenprotonen der Säure hervorgerufen wird. Die Auswertung der Integrale ergibt eine Anzahl von fünf

Protonen an C-C-Doppelbindungen (ein Proton im Sterol-Grundgerüst, die übrigen im Säurerest) und bestätigt damit das Vorhandensein einer zweifach ungesättigten Säure.

Auch für diese Verbindung gilt, daß die Signale geringerer Intensität im ^{13}C-NMR-Spektrum auf ein Gemisch ß-Sitosterol/Stigmasterol hindeuten.

Tabelle 7: ^{13}C-chemische Verschiebungen der Verbindung 3

C-Atom	3 δ [ppm]		2 δ [ppm]		Literatur [148] δ [ppm]
1	37,99	t	38,87	t	37,28
2	30,12	t	30,39	t	29,56
3	77,29	d	78,22	d	79,59
4	39,55	t	39,66	t	38,91
5	139,90	s	140,47	s	140,31
6	115,70	d	121,71	d	122,14
7	30,01	t	31,99	t	31,94
8	30,70	d	31,88	d	31,94
9	50,76	d	50,11	d	50,20
10	36,85	s	36,74	s	36,15
11	20,92	t	21,11	t	21,08
12	39,64	t	39,78	t	39,78
13	42,45	s	42,30	s	42,34
14	56,84	d	56,75	d	56,78
15	24,63	t	25,52	t	24,30
16	26,85	t	28,36	t	28,23
17	55,66	d	56,66	d	56,13
18	12,17	q	11,99	q	11,84
19	18,25	q	19,24	q	19,35
20	39,44	d	36,21	d	36,73
21	19,13	q	19,05	q	19,04

Fortsetzung der Tabelle 7:

C-Atom	3 δ [ppm]		2 δ [ppm]		Literatur [148] δ [ppm]
22	34,80	t	37,20	t	33,97
23	29,13	t	24,34	t	29,19
24	47,95	d	40,01	d	45,87
25	25,65	d	29,13	d	26,16
26	19,33	q	21,30	q	18,79
27	19,95	q	19,81	q	19,80
28	23,39	t	22,66	t	23,10
29	12,17	q	12,35	q	11,98
1’	106,03	d	102,36	d	101,22
2’	73,67	d	75,09	d	73,59
3’	77,14	d	78,36	d	76,60
4’	71,34	d	71,47	d	70,16
5’	73,45	d	77,96	d	73,95
6’	57,95	t	62,62	t	63,22
1’’	167,43	s			174,60
Methylen-	34,80	t			34,25
	26,49	t			24,97
	ca. 30	m			29,9
Methin-	128,79				
	129,00				
	115,70				
	115,60				
9’’	12,18				14,10

3.1.5. Isolierung und Identifizierung eines Bernsteinsäure-diamids 4

Die Fraktion DE 8 (siehe Abschnitt 3.1.3.) wurde zur Entfernung des großen Anteils an Chlorophyll über Aktivkohle filtriert. Dabei wurde festgestellt, daß der Substanzverlust durch diesen Reinigungsschritt sehr hoch ist (50% der

eingesetzten Substanzmenge wurden an der Aktivkohle adsorbiert!). Durch präparative Dickschichtchromatographie und anschließende mehrmalige Reinigung durch Säulenchromatographie über Sephadex LH_{20} und Umkristallisation aus MeOH wurde 4 als gelbliche, kristalline Substanz isoliert. Die dünnschicht-chromatographische Untersuchung ergab folgende Eigenschaften:

FM: 5
Rf-Wert: 0,55
Detektion: VIS: gelber Substanzfleck sichtbar
UV 254: keine Fluoreszenzlöschung
UV 366: schwach gelbe Fluoreszenz
Sprühreagenz 1: keine Anfärbung
Sprühreagenz 2: keine Anfärbung
Sprühreagenz 3: rosa Substanzfleck

Die Auswertung dieser Resultate läßt vermuten, daß es sich bei der Verbindung 4 nicht um eine terpenoide Verbindung handelt. Die Reaktion mit Ninhydrin deutet auf ein Amin hin.

Das IR-Spektrum (Abbildung 42) liefert folgende Banden:

Tabelle 8: IR-Daten der Verbindung 4

Wellenzahl [cm^{-1}]	Zuordnung	Schwingungsart
2850	C-H	Valenzschwingungen
2700	N-H	Valenzschwingungen
1712	C=O	Valenzschwingungen
1176	C-O	Valenzschwingungen

Die breite Bande bei 3350 cm^{-1} könnte N-H-Valenzschwingungen zugeordnet werden, welche allerdings bei sekundären Aminen nur schwach ausgeprägt

sind. Die Form der Bande deutet zwar eher auf Wasserspuren hin, die O-H-Valenzschwingungen liegen normalerweise aber höher.

Das ^{13}C-NMR-Spektrum (Abbildung 43) liefert sieben Kohlenstoffsignale, davon drei Signale als Triplett für CH_2, zwei Signale als Dublett für CH und zwei Signale für tertiäre C-Atome, die aufgrund ihrer Lage (176,19 ppm bzw. 178,66 ppm) auf C=O-Gruppen schließen lassen.

Das ^{1}H-NMR zeigt fünf verschiedene Signale mit ausgeprägtem Aufspaltungs- und Kopplungsmuster (siehe Abbildung 18). Um diese Kopplungen sichtbar zu machen, wurde ein H-H-COSY-Spektrum aufgenommen (Abbildung 19). Es stellt sich heraus, daß die Protonen, die das Signal bei 2,59 ppm verursachen, nicht mit anderen Protonen koppeln. Alle anderen Protonensignale weisen Kopplungen untereinander auf. Daraus folgt, daß diese CH_2-Gruppe isoliert von allen anderen, d.h. über mehrere Bindungen von der nächsten C-H-Bindung entfernt steht.

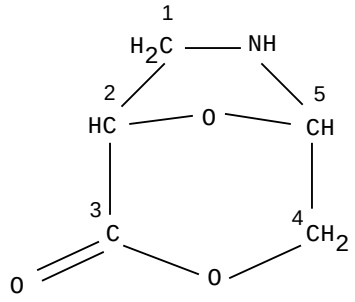
Aus den bisher vorliegende Daten resultiert die Überlegung, daß es sich bei der Verbindung 4 um einen Ester handeln könnte, dessen eine Komponente relativ einfach aufgebaut sein muß (Protonensignal bei 2,59 ppm ohne Kopplung), dessen andere Komponente möglicherweise cyclisch aufgebaut ist, worauf die Zahl der Kopplungen sowie das Fehlen von CH_3-Signalen hinweist. Letzteres bedeutet gleichzeitig, daß weder Säure- noch Alkohol-Komponente des vermuteten Esters eine CH_3-Gruppe an einem Ende aufweisen. Eine Möglichkeit könnte deshalb sein, daß es sich um eine symmetrische Dicarbonsäure handelt, die an beiden Säuregruppen gleich verestert ist. Unter der Annahme, daß das nicht-koppelnde Protonensignal bei 2,59 ppm der Säure zuzuordnen ist, muß es sich um eine Verbindung handeln, die nur ein Signal liefert. Dafür kommen nur zwei Verbindungen in Frage:

Malonsäure HOOC–CH_2–COOH und Bernsteinsäure HOOC–CH_2–CH_2–COOH.

Aus den Integralen des ^{1}H-NMR-Spektrum ergibt sich, daß dem Signal vier Protonen zugeordnet sind, daher müßte es sich um Bernsteinsäure handeln.

Spektrenvergleiche mit Literaturdaten der Bernsteinsäure ergeben Übereinstimmung, auch mit den Signalen aus dem ^{13}C-NMR-Spektrum [143]. Im ^{13}C-NMR ist das Signal bei 29,83 ppm den CH_2-Gruppen und das Signal bei 176,19 ppm der Carboxylgruppe zuzuordnen.

Die übrigen fünf Signale des ^{13}C-NMR-Spektrums gehören somit zu der Verbindung, die mit Bernsteinsäure verknüpft ist. Aus den spektroskopischen Daten ist folgende strukturelle Verknüpfung möglich:



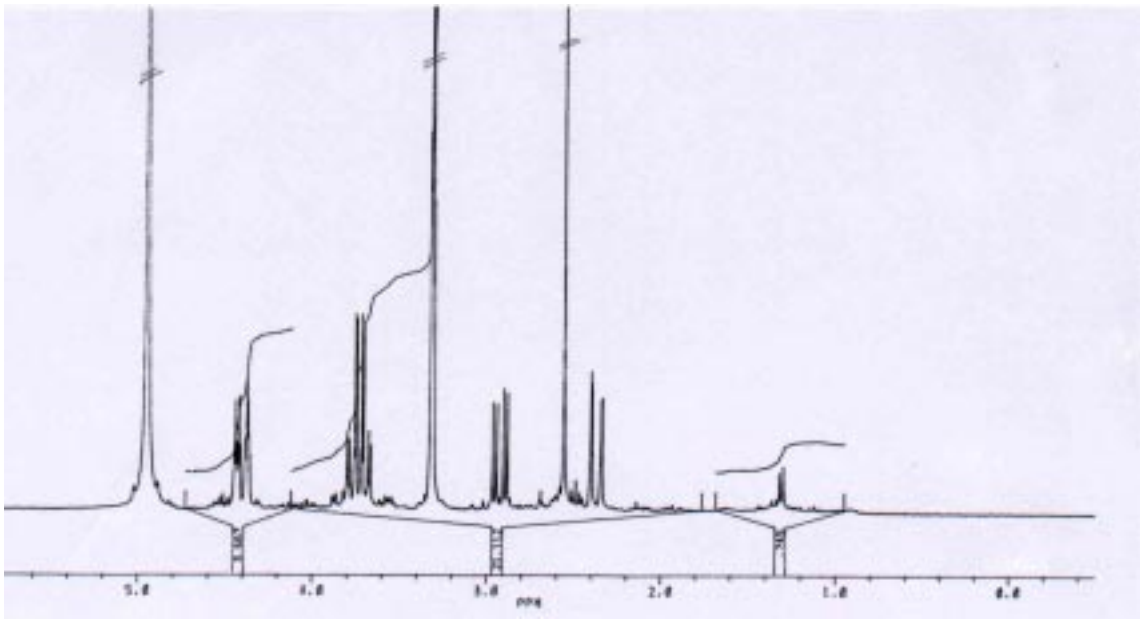
Dabei handelt es sich um einen ringförmigen, inneren Ester, also ein Lacton, welches über seine NH-Gruppe mit der Bernsteinsäure zu einem Amid verknüpft ist.

Die Protonensignale lassen sich innerhalb des Lactons wie folgt zuordnen:

Tabelle 9: ^{1}H-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung 4

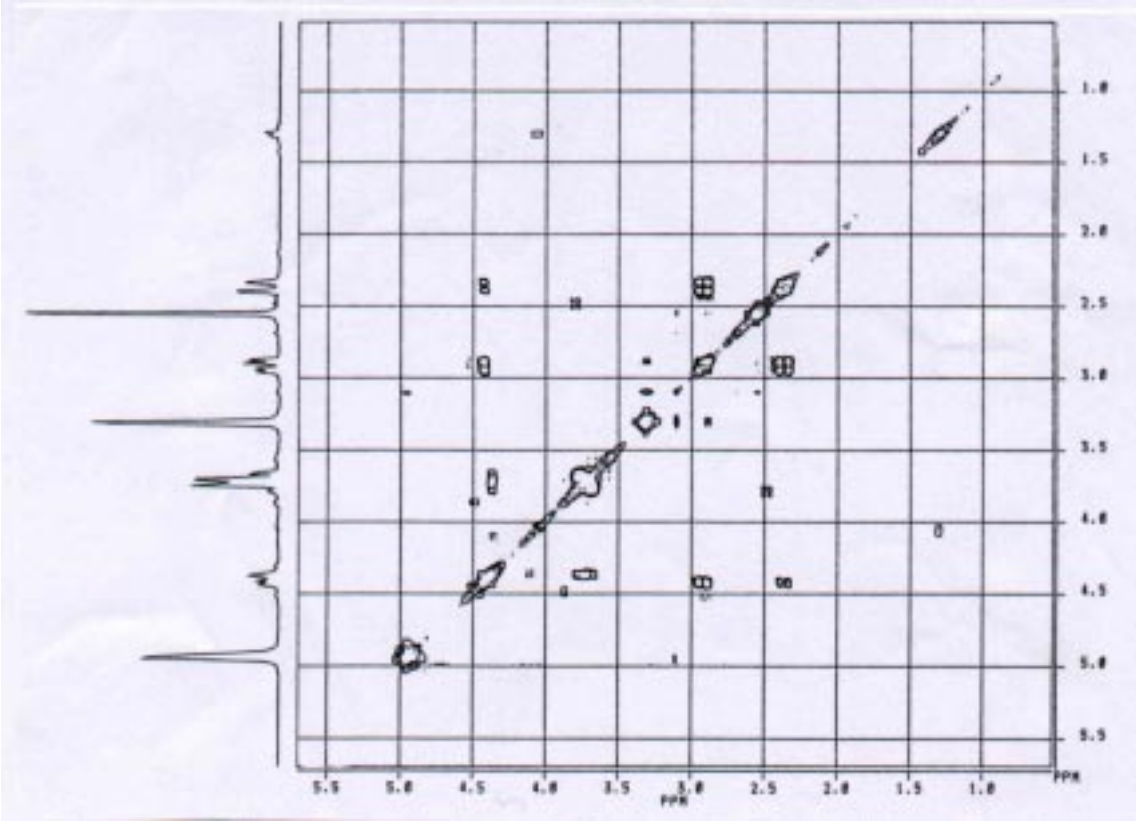
Proton(en) an C-Atom	Signal/ Integral		δ [ppm]
1	dd	2H	2,37
		2H	2,95
2	dd	2H	4,41
4	dd	4H	3,72
5	m	2H	4,39
2’	s	2H	2,58
3’	s	2H	2,58

Abbildung 18: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung 4 (in CD_3OD)



Aufgrund des Anisotropieeffektes weisen die beiden Protonen an C-1 unterschiedliche chemische Verschiebungen auf und koppeln zu dem Proton an C-2 unterschiedlich. Im H-H-COSY-Spektrum erkennt man die Kopplung zwischen den H-Atomen an C-1 untereinander bei 2,37 ppm bzw. 2,95 ppm und mit dem Proton an C-2 bei 4,41 ppm. Das Proton an C-2 koppelt wiederum mit dem an C-5. Außerdem koppeln die Protonen an C-4 bei 3,72 ppm mit dem Proton an C-5.

Abbildung 19: H-H-COSY-Spektrum der Verbindung 4 (in CD_3OD)

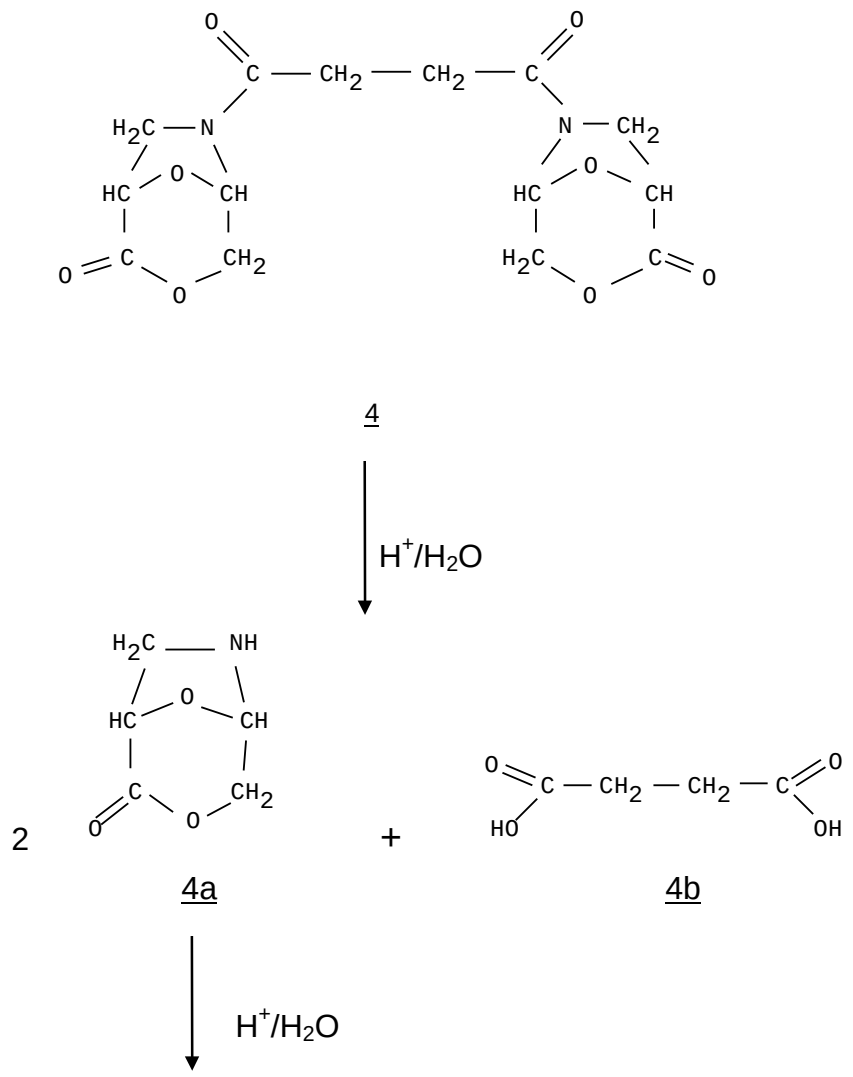


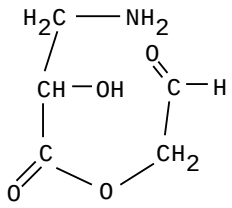
Die genaue Zuordnung der Kohlenstoffsignale zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10: ^{13}C-chemische Verschiebungen der Verbindung 4

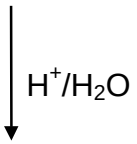
C-Atom	δ [ppm]	
1	39,17	t
2	69,71	d
3	178,66	s
4	62,55	t
5	90,19	d
1’	176,19	s
2’	30,48	t
3’	30,48	t
4’	176,19	s

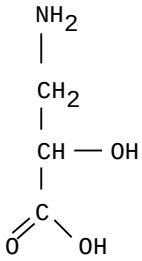
Die vorgeschlagene Struktur stellt natürlich keine sehr stabile Verbindung dar. Im sauren Milieu wird die Bindung zwischen Bernsteinsäure und dem Lacton gespalten, außerdem wird auch dieses sowohl durch Säuren als auch durch Basen weiter gespalten:



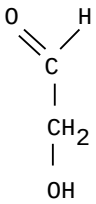


4c





+



4d 4e

Esterspaltungen/Veresterungen laufen sehr schnell ab. Die dabei entstehenden Verbindungen 4d und 4e kommen in Pflanzen vor. Lactone sind als strukturelle Bauelemente von Pflanzen verbreitet anzutreffen, das bekanntestes Beispiel sind die Cumarine.

Der Aminosäure-Rest 4d erklärt die positive Ninhydrinreaktion beim dünnschichtchromatographischen Nachweis von 4.

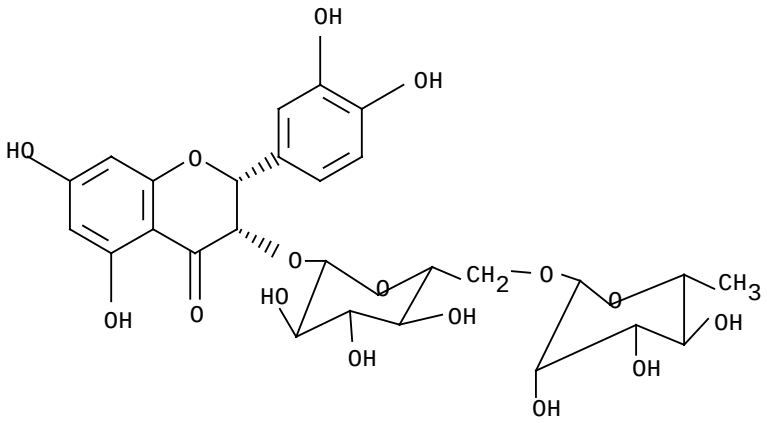
3.1.6. Isolierung und Identifizierung von Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin) 5

Die Isolierung dieses Flavonoids gelang aus dem Methanol-Teilextrakt. Dieser wurde zunächst durch Säulenchromatographie mit Amberlit XAD-2 mit einem Lösungsmittelgradienten $H_2O \rightarrow MeOH$ in 44 Fraktionen aufgetrennt, die nach dünnschichtchromatographischer Untersuchung zu fünf Fraktionen Me1 bis Me5 zusammengefaßt wurden. Die Fraktionen Me2 und Me3 zeigten auf dem Dünnschichtchromatogramm nach Besprühen mit Diphenylborsäure-2-aminoethylester-Reagenz (Naturstoff-reagenz nach Neu) im langwelligen UV intensiv gelbe bis orange Substanzzonen, die auf Flavonoide hindeuten. Die Fraktion Me3 wurde durch Säulenchromatographie mit Sephadex LH_{20} weiter aufgetrennt. Dabei fiel die Verbindung 5 aus den Fraktionen 16-40 nach Verdunsten des Lösungsmittels als olivgrüne pulverförmige Substanz an, die nur noch in heißem H_2O, Pyridin und DMSO löslich war. Schmelzpunktbestimmung und dc-Vergleiche ergaben Übereinstimmung mit Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin):

Dünnschichtchromatographische Daten:

FM: 7
Rf-Wert: 0,20
Detektion: Sprühreagenz 2: sichtbarer gelber Substanzfleck

FM: 8
Rf-Wert: 0,25
Detektion: Sprühreagenz 5: UV 365 nm: intensiv gelbe Fluoreszenz

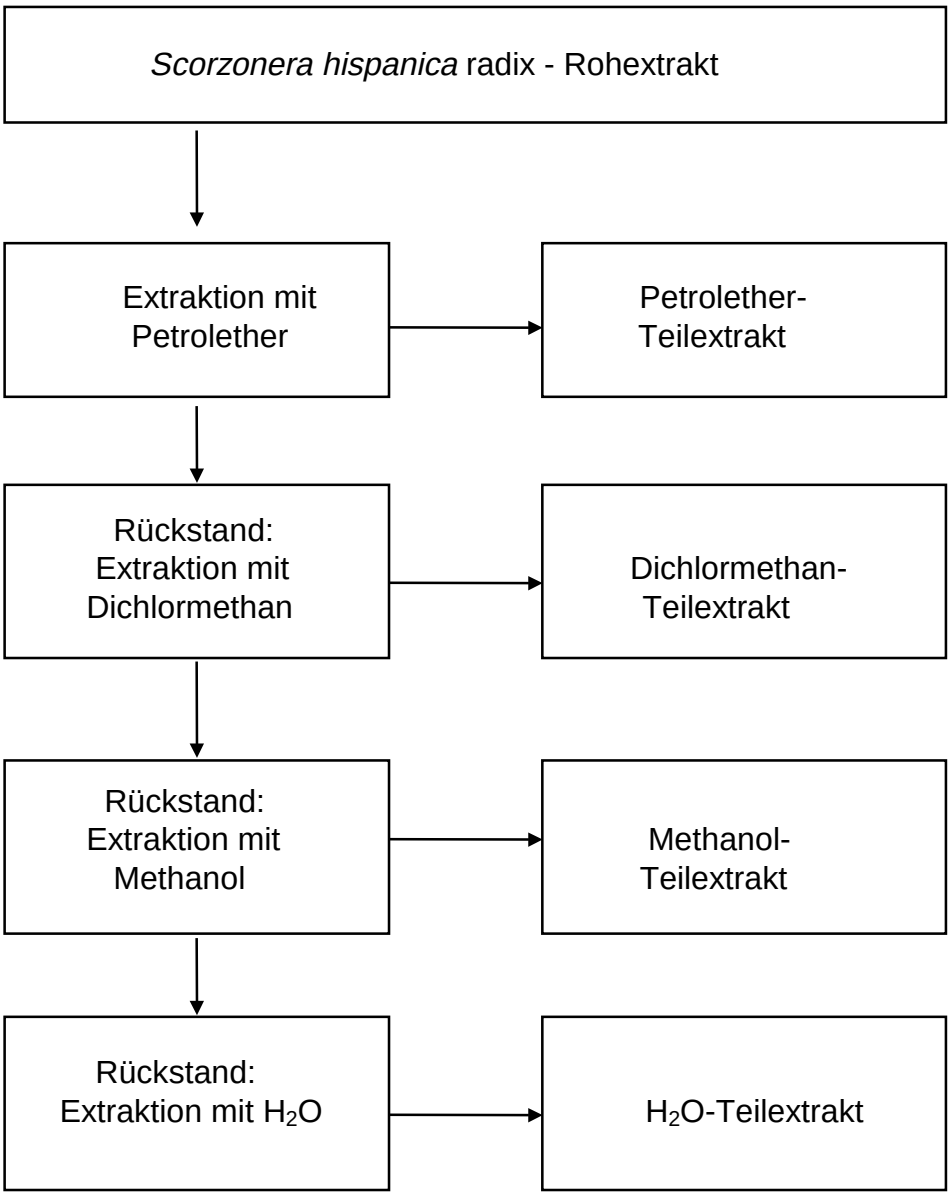


Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin) 5

3.2. Chromatographische Auftrennung von *Scorzonera hispanica* L.

3.2.1. Auftrennung in Teilextrakte und Fraktionierung

Der Isopropanol-Rohextrakt der unterirdischen Teile der Schwarzwurzel wurde entsprechend folgendem Schema analog zur Vorgehensweise bei der Ringelblume in Teilextrakte unterschiedlicher Polarität aufgetrennt:



Die abschließende Extraktion mit H_2O war wegen des hohen Zuckergehaltes des Schwarzwurzel-Rohextraktes notwendig.

3.2.2. Isolierung und Identifizierung von β-Sitosterol 1 und Stigmasterol 6

Die Sterole 1 und 6 wurden aus dem Petrolether-Teilextrakt isoliert. Der Teilextrakt wies nach Abrotieren des Lösungsmittels eine gelblich-bräunliche Färbung, durchsetzt mit farblosen bis weißen kristallinen Teilen, auf. Durch Waschen mit n-Hexan konnten die nichtkristallinen Anteile entfernt werden. Die isolierten Kristalle wurden durch präparative Dickschichtchromatographie gereinigt.

Die dünnschichtchromatographische Kontrolle ergab folgende Ergebnisse:

FM: 1

Rf-Werte:	0,26 (6)	0,24 (1)
Detektion: Sprühreagenz 2:	lila-blauer Substanzfleck	rosa Substanzfleck
Sprühreagenz 4:	hellgelb fluoreszierend	

NMR-spektroskopische Untersuchungen und Vergleich mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigte das Vorliegen von Stigmast-5-en-3-ol (β-Sitosterol) und Stigmast-5,22-dien-3-ol (Stigmasterol). Aufgrund der geringen strukturellen Differenzen konnte keine vollständige Trennung der beiden Sterole erreicht werden, sondern nur eine Anreicherung.

3.2.3. Isolierung und Identifizierung von Sitosterol-3-O-β-D-glucosid 2 und eines 6''-O-Fettsäureesters von Sitosterol-3-O-ß-D-di-glykosid 7

Wie schon in der Ringelblume ist auch in der Schwarzwurzel β-Sitosterol das vorherrschende Sterol. Da diese Verbindungen sowohl frei als auch verestert oder als Glykoside vorliegen, überrascht es nicht, wenn auch aus der Schwarzwurzel Steroide isoliert werden.

Die Verbindung 2 wurde bei der säulenchromatographischen Auftrennung des Dichlormethan-Teilextraktes an Kieselgel aus den letzten aufgefangenen Fraktionen isoliert. Nach Abtrennung des Lösungsmittels und erneutem Lösen fiel die Verbindung 2 als unlöslicher Rückstand in Form farbloser Kristalle an, die sich nur in Pyridin und DMSO lösten.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung ergab Übereinstimmung mit den bereits im Abschnitt 3.1.3. besprochenen ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren für Sitosterol-3-O-β-D-glucosid 2.

Ebenfalls aus dem Dichlormethan-Teilextrakt wurde die Verbindung 7 isoliert. Sie fiel allerdings schon vor der Säulenchromatographie als in allen Lösungsmitteln außer Pyridin unlöslicher Rückstand in gelblich-weißer kristalliner Form an. Dieses Löslichkeitsverhalten ist ein erster Hinweis auf eine glykosidische Verbindung. Aufschluß über die genaue Struktur liefert das ^{13}C-NMR-Spektrum (Tabelle 11).

Es finden sich 29 Signale, die genaue Übereinstimmung mit denen für β-Sitosterol zeigen und weitere Signale für Glucose. Die in 3-Stellung erfolgte Glykosidierung beweist das Signal für C-3 bei 78,48 ppm. Im Bereich zwischen 70 und 80 ppm werden insgesamt 8 Signale detektiert. Für Glucose erwartet man dort nur 4 Signale (CH-2’ bis CH-5’); daher muß es sich um zwei Zuckermoleküle handeln, die glykosidisch gebunden sind. Darüberhinaus finden sich im ^{13}C-NMR-Spektrum Signale bei 175,16 ppm (s), 130,68 ppm (d), 130,55 ppm(d), 35,55 ppm (t), 33,15 ppm (t), 32,84 ppm (t), mehrere übereinander liegende Peaks bei 30,14 ppm (t) sowie ein Signal für eine CH_3-Gruppe bei 14,13 ppm. Dieses Signalmuster ist typisch für eine einfach ungesättigte Fettsäure. Da das 6’’-C-Atom im Vergleich zu C-6’ geshiftet ist, liegt das zweite Zuckermolekül in 6’’-Stellung verestert vor. Die Struktur der Verbindung 7 ist hinsichtlich der Verknüpfung - unter Berücksichtigung des zusätzlichen Zuckermoleküls - mit der Struktur der Verbindung 3 vergleichbar.

Tabelle 11: ^{13}C-chemische Verschiebungen der Verbindung 7

C-Atom	7 δ [ppm]		2 δ [ppm]	
1	37,36	t	38,87	t
2	29,86	t	30,39	t
3	78,48	d	78,22	d
4	39,22	t	39,66	t
5	140,80	s	140,47	s
6	121,80	d	121,71	d
7	31,79	t	31,99	t
8	31,79	d	31,88	d
9	50,23	d	50,11	d
10	36,27	s	36,74	s
11	21,17	t	21,11	t
12	39,83	t	39,78	t
13	42,36	s	42,30	s
14	56,71	d	56,75	d
15	24,39	t	25,52	t
16	28,42	t	28,36	t
17	56,14	d	56,66	d
18	11,86	q	11,99	q
19	19,84	q	19,24	q
20	36,81	d	36,21	d
21	19,29	q	19,05	q
22	34,09	t	37,20	t
23	30,13	t	24,34	t
24	45,93	d	40,01	d
25	29,36	d	29,13	d
26	18,89	q	21,30	q
27	19,09	q	19,81	q
28	23,28	t	22,66	t
29	12,03	q	12,35	q
1’	102,46	d	102,36	d
2’	75,22	d	75,09	d
3’	78,35	d	78,36	d
4’	72,33	d	71,47	d
5’	78,35	d	77,96	d
6’	62,72	t	62,62	t
1’’	102,46	d		
2’’	72,76	d		
3’’	78,00	d		

Fortsetzung der Tabelle 11:

C-Atom	7 δ [ppm]	
4''	71,58	d
5''	76,68	d
6''	61,86	t
1'''	175,16	s
Methylen-	ca. 30,13	m
	32,84	t
	33,15	t
	35,55	t
Methin-	130,55	d
	130,68	d
Methyl-	14,13	q

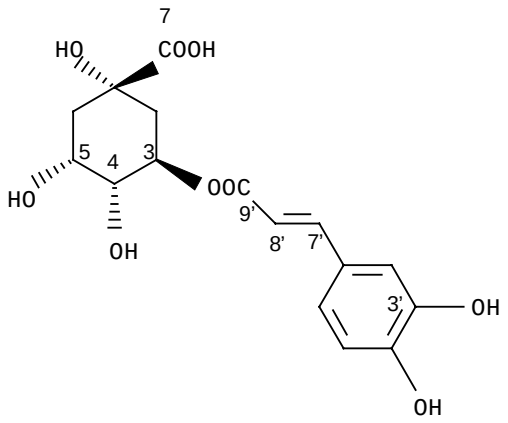
3.2.4. Isolierung und Identifizierung von Chlorogensäure 8

Der Methanol-Teilextrakt wurde durch Säulenchromatographie mit Sephadex LH_{20} in 166 Fraktionen aufgetrennt, die nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle zu 7 Fraktionen zusammengefaßt wurden. Aus der Fraktion 1 wurde nach nochmaliger Reinigung über Sephadex LH_{20} die Verbindung 8 als schwach gelbliche Kristalle erhalten.

Die dünnschichtchromatographischen Daten sind:

FM: 7
Rf-Wert: 0,75
Detektion: Sprühreagenz 2: gelber Substanzfleck
intensive gelbe Fluoreszenz bei 365 nm

Abbildung 20: Chlorogensäure (3-O-Kaffeeoylchinasäure)



Chlorogensäure ist als Bestandteil vieler Pflanzen bekannt und wurde in der Schwarzwurzel bereits nachgewiesen [123-125].

Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-spektroskopischen Daten (siehe Abbildungen 45 und 46) ergaben Übereinstimmung mit den Literaturdaten.

Tabelle 12: ^{1}H-MNR-spektroskopische Daten der Verbindung 8

Signal an C-Atom	δ [ppm]		Literatur [143] δ [ppm]
2	2,0-2,25	m	1,70-2,35
3	5,34	m	5,21
4	4,18	dd	4,07
5	3,75	dd	3,60
6	2,0-2,25	m	1,70-2,25
2’	7,07	d	7,00
5’	6,79	d	6,76
6’	6,97	dd	6,90
7’	6,26	d	6,17
8’	7,58	d	7,44

Tabelle 13: ^{13}C-NMR-spektroskopische Daten der Verbindung 8

C-Atom	δ [ppm] / Signal		Literatur [144] δ [ppm]
1	76,15	s	76,6
2	38,18	t	38,3
3	73,46	d	70,6
4	71,95	d	72,8
5	71,28	d	71,0
6	38,76	t	37,3
7	177,09	s	180,1
1’	127,77	s	126,6
2’	115,21	d	114,1
3’	146,75	s	144,2
4’	149,53	s	147,0
5’	115,21	d	116,0
6’	116,49	d	122,6
7’	147,09	d	145,9
8’	116,49	d	115,2
9’	168,72	s	168,9

Im Massenspektrum (siehe Abbildung 47) findet man den Molekülpeak bei m/z 354, was genau der Molmasse von Chlorogensäure von 354,31 g/mol entspricht. Der Massenpeak bei m/z 163 entspricht dem Kaffeesäure-Fragment $C_9H_7O_3$.

3.2.5. Isolierung und Identifizierung von 3-Acetoxy-urs-12-en 9

Der Petrolether-Teilextrakt wurde durch Säulenchromatographie mit Kieselgel getrennt. Es wurden mit einem Laufmittelgradienten n-Hexan → Essigester insgesamt 460 Fraktionen aufgefangen. Aus den Fraktionen 45-71 konnte die Verbindung 9 als farblose bis schwach gelbliche feste, filmartige Substanz isoliert werden. Es konnte dc nachgewiesen werden, daß der Chloroform-Teilextrakt ebenfalls 3-Acetoxy-urs-12-en enthält.

Dünnschichtchromatographische Daten der Verbindung 9:

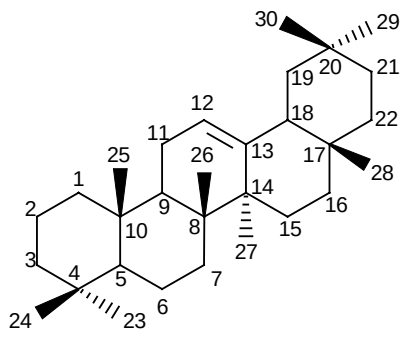
FM 1
Rf-Wert: 0,82
Detektion: -UV 254: keine Fluoreszenzlöschung
-UV 366: keine Eigenfluoreszenz
-Sprühreagenz 2: intensiv oranger Substanzfleck, der sich nach einigen Stunden lila färbt

Aufgrund dieser chromatographischen Aussagen sollte die Verbindung 9 sehr unpolar sein. Die Unlöslichkeit in Petrolether und n-Hexan bedeutet allerdings, daß es sich nicht um eine fettähnliche Verbindung handelt. Die Färbung auf der Dünnschichtplatte und die ausschließliche Löslichkeit in Chloroform und Dichlormethan deuten auf eine Triterpen- oder Sterinverbindung hin.

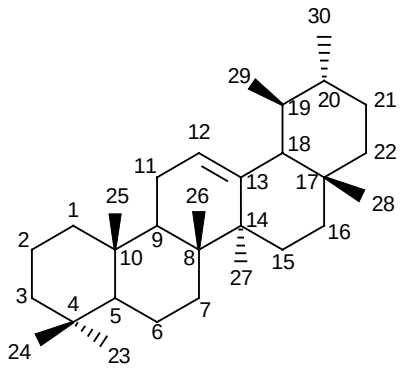
Das Protonenspektrum (siehe Abbildung 48) weist im tiefen Feld zwischen 0,8 ppm und 1,8 ppm das typische Signalmuster der Methyl- und Methylengruppen eines Triterpens auf. Das Singulett bei 2,08 ppm wird durch eine Acetyl-Gruppe hervorgerufen. Daß im Bereich zwischen 2,1 ppm und 4 ppm kein Signal zu finden ist, ist ein Hinweis darauf, daß die sonst in 3-Stellung häufige freie OH-Gruppe fehlt bzw. gebunden ist. Entspechend findet man bei 4,5 ppm ein Signal, welches von einem Proton in Nachbarschaft zu einer Carboxylgruppe hervorgerufen wird. Daraus ist zu schließen, daß die OH-Gruppe acetyliert ist.

Im ^{13}C-NMR-Spektrum (Abbildung 49) findet man 32 Signale. Unter Berücksichtigung der Acetoxy-Gruppe als Substituent bedeutet das, daß es sich um ein C_{30}-Grundgerüst und somit um ein Triterpen handelt. Das Signal bei 170,95 ppm bestätigt das Vorhandensein einer Estergruppe. Die Signale bei 124,28 ppm (CH) und bei 139,59 ppm (tertiäres C-Atom) deuten darauf hin, daß eine Doppelbindung im Terpengrundgerüst vorhanden ist. Charakteristische Signale dieses Spektrums sind die beiden Peaks bei 55 ppm und 59 ppm. Diese Peaks sind typisch für eine Oleanen- oder Ursen-Grundstruktur, wo sie durch C-H an C-5 bzw. C-18 hervorgerufen werden:

Abbildung 21:



Δ^{12}-Oleanen



Δ^{12}-Ursen

Welche der beiden Strukturen die Verbindung 9 besitzt, muß durch ^{13}C-NMR-spektroskopische Untersuchung geklärt werden.

Tabelle 14: ^{13}C-chemische Verschiebung der Verbindung 9

C-Atom	δ [ppm]	Literatur [150] δ [ppm]
1	38,22 t	38,4
2	23,57 t	23,6
3	80,89 d	80,7

Fortsetzung der Tabelle 14:

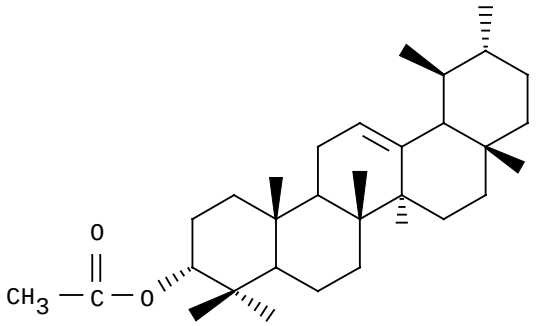
C-Atom	δ [ppm]		Literatur [150] δ [ppm]
4	37,67	s	37,6
5	55,54	d	55,5
6	18,21	t	18,3
7	32,83	t	32,8
8	39,98	s	40,1
9	47,52	d	47,6
10	36,80	s	36,8
11	23,50	t	23,2
12	124,26	d	124,1
13	139,59	s	139,4
14	42,02	s	42,1
15	28,37	t	28,7
16	26,88	t	26,7
17	33,71	s	33,8
18	59,01	d	59,0
19	39,58	d	39,7
20	39,58	d	39,7
21	31,21	t	31,3
22	41,50	t	41,5
23	28,37	q	28,1
24	16,83	q	16,8
25	15,71	q	15,7
26	16,72	q	16,8
27	23,33	q	23,2
28	28,05	q	28,1
29	17,48	q	17,5
30	21,38	q	21,8
1’	170,95	s	170,4
2’	21,29	q	21,2

Im ^{13}C-NMR-Spektrum liegen die Peaks für C-19 und C-20 aufeinander und lassen sich durch die DEPT-Aufspaltung nicht in -CH_2- und tertiäres C unterscheiden, wie das bei einer Oleanen-Grundstruktur der Fall wäre. Der Vergleich der chemischen Verschiebungen mit der Literatur ergibt deshalb Übereinstimmung mit den ^{13}C-Daten für 3-Acetoxy-urs-12-en [150].

Im Massenspektrum (Abbildung 50) entspricht der [M+1]-Peak bei m/z 469 genau Acetoxy-urs-12-en ($C_{32}H_{52}O_2$) mit der Molmasse 468,79 g/mol.

Die Verbindung 9 besitzt somit folgende Struktur:

Abbildung 22: 3-Acetoxy-urs-12-en 9



3.2.6. Isolierung und Identifizierung von 3-Oxo-urs-12-en 10

Analog zur Verbindung 9 wurde die Verbindung 10 durch Säulenchromatographie mit Kieselgel aus dem Petrolether-Teilextrakt als farbloser bis schwach gelblicher Film isoliert.

Die dünnschichtchromatographischen Daten sind:

FM 1
Rf-Wert: 0,72
Detektion: -UV 254: keine Fluoreszenzlöschung
-UV 366: keine Eigenfluoreszenz
-Sprühreagenz 2: orange-brauner Substanzfleck, der sich nach einigen Stunden lila färbt

Sowohl das ^{1}H-NMR- als auch das ^{13}C-NMR-Spektrum weisen bis auf einzelne Signale Übereinstimmung mit den Spektren der Verbindung 9 auf. Da auch die dünnschichtchromatographische Charakterisierung vergleichbar ist (wobei die Polarität etwas höher ist als 9), sollte es sich bei der Verbindung 10 ebenfalls um ein Triterpen gleicher oder ähnlicher Grundstruktur handeln.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abbildung 51) fällt auf, daß im Bereich oberhalb von 3 ppm nur ein Peak (5,14 ppm) registriert wird. Die Integration ergibt 1H, welches an einer C-C-Doppelbindung sitzt. Bei 2,46 ppm erscheint ein Multiplett, dessen Integrale 2H entsprechen. In diesem Bereich absorbieren Methylengruppen nur in Nachbarschaft zu C=O. Andererseits erscheinen im Bereich zwischen 3 und 5 ppm keine Signale für Protonen neben einer C-O-Einfachbindung wie im Fall einer an C-3 sitzenden OH-Gruppe, wie es für Triterpenalkohole üblich ist.

Das ^{13}C-NMR-Spektrum (Tabelle 15) weist die schon aus dem Spektrum der Verbindung 9 bekannten Peaks bei 55 ppm bzw. 59 ppm auf. Außerdem weisen die Signale bei 139 ppm (Singulett) und bei 124 ppm (Dublett) auf eine Doppelbindung hin. Somit liegt auch hier wieder eine Oleanen- oder Ursenstruktur vor. Im Bereich der chemischen Verschiebung von Kohlenstoff aus einer C-O-Bindung findet sich kein Signal. Das bestätigt das Ergebnis aus dem Protonenspektrum, bei dem ebenfalls keine Hinweise auf eine C-O-(Einfach-) oder H-O-Bindung gefunden wurden. Der Vergleich der ^{13}C-chemischen Verschiebungen der Verbindung 10 ergibt Übereinstimmung mit den Literaturdaten für eine 3-Oxo-Verbindung vom Ursentyp [150]. Allerdings ist das Signal der Carbonylgruppe (C-3) im ^{13}C-NMR-Spektrum im Bereich um 216 ppm nicht eindeutig zu detektieren. Im IR-Spektrum findet man jedoch bei 1710 cm^{-1} eine Bande, die C=O-Valenzschwingung in Ketonen entspricht. Dadurch wird die vermutete Struktur bewiesen.

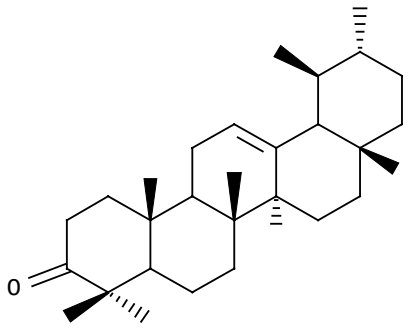
Tabelle 15: ^{13}C-chemische Verschiebungen der Verbindung 10

C-Atom	10 δ [ppm]		Literatur [150] δ [ppm]
1	38,67	t	39,3
2	34,21	t	34,2
3			216,8
4	47,43	s	47,3
5	55,24	d	55,2
6	19,05	t	19,5
7	32,45	t	32,4
8	39,99	s	39,1
9	46,91	d	46,6
10	36,60	s	36,6
11	23,53	t	23,4
12	124,16	d	125,0
13	139,73	s	137,9
14	42,22	s	41,9
15	29,69	t	27,9
16	28,06	t	24,1*
17	33,79	t	47,9*
18	59,13	d	52,8*
19	40,29	d	38,8
20	40,06	d	38,8
21	31,23	t	30,5
22	41,49	t	36,6*
23	26,57	q	26,5
24	21,37	q	21,3
25	15,48	q	15,1
26	16,81	q	16,8
27	23,18	q	23,4
28	28,76	q	177,3*
29	17,46	q	16,8
30	21,50	q	21,1

*Die Vergleichsverbindung besitzt in 17-Stellung anstelle der CH_3-Gruppe eine -$COOCH_3$-Gruppe.

Daraus läßt sich folgende Struktur schlußfolgern:

Abbildung 23: 3-Oxo-urs-12-en 10



Das Massenspektrum (Abbildung 52) weist einen [M+1]-Peak bei m/z 425 auf. Dieser entspricht der Molmasse von Oxo-ursen ($C_{30}H_{48}O$) von 424,76 g/mol. Das erste abgespaltene Fragment-Ion mit m/z 15 entspricht einer Methylgruppe.

3.2.7. Isolierung und Identifizierung von α-Amyrin 11

Die dritte Verbindung, die aus der Kieselgelsäule des Petrolether-Teilextraktes isoliert wurde, fiel nach Waschen mit Methanol und Umkristallisation aus Dichlormethan als weiße, kristalline Substanz an. Im Chloroform-Teilextrakt wurde die Verbindung 11 ebenfalls dc nachgewiesen.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung ergab vergleichbare Ergebnisse mit denen der vorher besprochenen Triterpenverbindungen:

FM 1
Rf-Wert: 0,48
Detektion: -UV 254: keine Fluoreszenzlöschung
-UV 366: keine Eigenfluoreszenz
-Sprühreagenz 2: zunächst kräftig orangefarbener, später lila Fleck

Aufgrund der etwas höheren Polarität (kleinerer Rf-Wert bei gleichen Fließbedingungen als 9 und 10) sollte es sich bei der Verbindung 11 ebenfalls um ein Triterpen ähnlicher Grundstruktur, aber mit polarerem Substituenten handeln. Aufschluß über die genaue Struktur gibt wie immer die spektroskopische Untersuchung:

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abbildung 53) weist im hohen Feld Übereinstimmung mit den Spektren der bereits besprochenen Triterpenen auf. Das Multiplett bei 3,22 ppm steht für ein H in Nachbarschaft zu einer C-O-Bindung, möglicherweise einer OH-Gruppe. Das Signal bei 5,14 ppm deutet auf eine Doppelbindung im terpenoiden oder steroidalen Grundgerüst hin.

Im ^{13}C-NMR-Spektrum (Abbildung 54) findet man entsprechende Peaks bei 139 ppm und 124 ppm, die das Vorhandensein einer C-C-Doppelbindung beweisen. Weiterhin entspricht das Signal bei 79 ppm (d) dem Kohlenstoffatom an einer C-O-Bindung, dessen H-Signal im Protonenspektrum bei 3,22 ppm gefunden wurde. Die für eine Ursen- bzw. Oleanen-Grundstruktur typischen Signale bei 55 ppm und 59 ppm werden auch in diesem Spektrum detektiert. Alle übrigen Signale befinden sich im hohen Feld und gehören zum terpenoiden Grundgerüst. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß es sich bei der Verbindung 11 um ein Ursen oder Oleanen mit einer OH-Gruppe handelt, also um α- oder ß-Amyrin.

Tabelle 16: ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen der Verbindung 11

C-Atom	δ [ppm]	Literatur [146] δ [ppm]
1	38,77 t	38,95 t
2	27,02 t	27,35 t
3	79,21 d	78,97 d
4	38,77 s	38.78 s

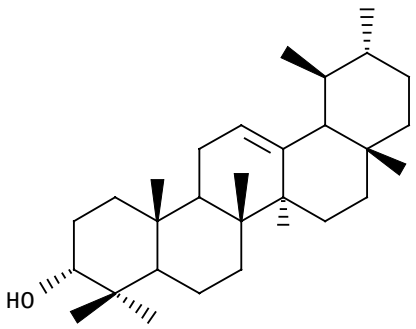
Fortsetzung der Tabelle 16:

C-Atom	δ [ppm]		Literatur [146] δ [ppm]	
5	55,18	d	55,34	d
6	18,35	t	18,45	t
7	32,93	t	33,07	t
8	40,01	s	40,13	s
9	47,72	d	47,85	d
10	36,89	s	36,95	s
11	23,36	t	23,41	t
12	124,36	d	124,50	d
13	139,59	s	139,60	s
14	42,21	s	42,18	s
15	26,61	t	26,70	t
16	27,27	t	28,16	t
17	33,86	s	33,77	s
18	59,07	d	59,19	d
19	39,60	d	39,76	d
20	39,60	d	39,65	d
21	31,25	t	31,29	t
22	41,52	t	41,59	t
23	28,55	q	28,16	q
24	15,65	q	15,65	q
25	15,65	q	15,65	q
26	16,84	q	16,95	q
27	23,26	q	23,25	q
28	28,09	q	28,75	q
29	17,45	q	17,48	q
30	21,43	q	21,36	q

Da die Signale an C-19 und C-20 jeweils Dublettcharakter aufweisen, liegt auch hier wieder eine Ursenstruktur vor. Die Tieffeldverschiebung des Signals von C-3 zeigt, daß an diesem C die OH-Gruppe lokalisiert ist. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen mit den Literaturdaten für α-Amyrin (Urs-12-en-3β-ol) ergibt sehr gute Übereinstimmung.

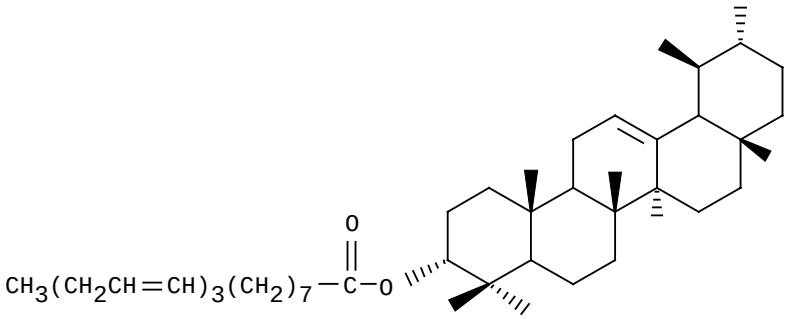
Das Massenspektrum liefert einen Molekülpeak bei m/z 426, der genau der Molmasse von α-Amyrin von 426,73 g/mol entspricht.

Abbildung 24: α-Amyrin 11
(Urs-12-en-3β-ol)



3.2.8. Isolierung und Identifizierung von Urs-12-en-3β-yl-linolenat 12

Abbildung 25:



Die Verbindung 12 wurde aus dem Petrolether-Teilextrakt durch Säulenchromatographie mit Kieselgel isoliert und anschließend durch präparative Dickschichtchromatographie gereinigt. Außerdem fiel sie aus dem Chloroform-Teilextrakt beim Lösen in Methanol als unlöslicher Rückstand an. Die Verbindung 12 löste sich nur in Chloroform und Dichlormethan und wurde nach

Entfernen des Lösungsmittels als farblose Substanz von zäher bis fester Konsistenz erhalten. Die dünnschichtchromatographische Charakterisierung zeigte Übereinstimmung in den wesentlichen Merkmalen mit den Verbindungen 9 bis 11:

FM 1
Rf-Wert: 0,94
Detektion: -UV 254: keine Fluoreszenzlöschung
-UV 366: keine Eigenfluoreszenz
-Sprühreagenz 2: intensiv orangefarbener Substanzfleck, nach einigen Stunden lila Färbung

Die NMR-spektroskopische Untersuchung (siehe Abbildungen 55 und 56) ergibt wiederum Hinweise auf ein Ursenderivat. Im ^{13}C-NMR-Spektrum finden sich die charakteristischen Peaks bei 55 ppm und 59 ppm. Auch die weiteren Signale zeigen Übereinstimmung mit den chemischen Verschiebungen für ein Ursen-Grundgerüst, wie beispielsweise die Peaks für C-12 und C-13, zwischen denen die Doppelbindung lokalisiert ist, bei 124 ppm bzw. 139 ppm. An C-3 befindet sich eine C-O-Bindung, wie die chemische Verschiebung von 80,6 ppm zeigt. Zusätzlich findet sich bei 173 ppm ein Singulett, welches wie schon bei der Verbindung 9 einem Carboxyl-Kohlenstoff zuzuordnen ist. Weiterhin finden sich im Bereich um 130 ppm 6 CH-Signale, die für ungesättigte Fettsäuren wie Linolensäure typisch sind. Im hohen Feld bei 30 ppm befinden sich die zu dieser Säure gehörenden CH_2-Signale. Somit handelt es sich bei der Verbindung 12 um einen Fettsäureester von α-Amyrin.

Das Massenspektrum zeigt, wie auch schon die Vielzahl kleinerer Peaks im ^{13}C-NMR-Spektrum, daß es sich hier um ein Gemisch von α-Amyrin jeweils mit verschiedenen Fettsäuren verestert handeln muß. Der Massenpeak bei m/z 688 entspricht dabei der Molmasse von Urs-12-en-3ß-yl-linolenat ($C_{48}H_{79}O_2$) von 688,16 g/mol. Darüberhinaus finden sich weitere [M+1]-Peaks bei m/z 679 und m/z 663. Da die Differenz jeweils zu gering ist, um auf ein abgespaltenes Fragment-Ion hinzudeuten, muß es sich um die Molekülpeaks der anderen im Gemisch vorhandenen Fettsäureester handeln.

4. Untersuchung der antihämorrhagischen Wirksamkeit

Mit den Pflanzenextrakten und den daraus isolierten Substanzen wurden verschiedene biologische Tests durchgeführt, um die Wirksamkeit gegen Schlangengifte zu untersuchen.

Dabei muß unterschieden werden zwischen der Untersuchung der Wirksamkeit zum einen gegen die letale und zum anderen gegen die hämorrhagische Wirkung des Giftes.

Die Versuche zur Ermittlung der antiletalen Wirkung einer Probe (Ermittlung der LD_{50}- und ED_{50}-Werte; siehe Abschnitte 4.1.3. und 4.1.4.) können nur *in vivo* durchgeführt werden, das heißt, es steht keine Alternative zum Tierversuch zur Verfügung.

Zur Ermittlung der antihämorrhagischen Aktivität wurde 1997 von der Arbeitsgruppe von David Theakston an der Liverpool School of Tropical Medicine ein *in ovo*-Test entwickelt, bei dem ein bebrütetes Hühnerei das Versuchstier ersetzt [152]. Da sich dieser Test zu Beginn der Arbeiten zu dieser Dissertation noch in der Versuchsphase befand, wurden auch die Tests auf antihämorrhagische Aktivität zunächst *in vivo* durchgeführt und zu späterem Zeitpunkt ebenfalls mit ausgewählten Substanzen. Damit sollte eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden. Alle zur Verfügung stehenden Proben wurden aber zuvor *in ovo* getestet, d.h. dieser Test wurde als eine screening-Methode benutzt (siehe Abschnitt 4.2.).

4.1 *In vivo*-Tests

4.1.1. Durchführung

Die *in vivo*-Tests wurden nach der von der WHO anerkannten Standardmethode durchgeführt [24]. Als Versuchstiere dienten männliche

CFW-Mäuse (18-20g). Für die MHD-Versuche wurden auch Ratten (Sprague Dawley, 250 g) verwendet. Für die Untersuchung der antihämorrhagischen Aktivität der Pflanzenextrakte und der daraus isolierten Verbindungen wurde lyophilisiertes Gift der Sandrasselotter *Echis leucogaster* (Mali) verwandt. Zusätzlich wurde die antihämorrhagische Wirkung des *Calendula officinalis*-Rohextraktes auf das Gift weiterer Schlangen (*Bothrops jararaca, Calloselasma rhodostoma, Crotalus atrox, Bitis arietans, Daboia russelii russelii, Naja kaouthia*) untersucht. Die Versuche wurden zum überwiegenden Teil im Venom Research Unit der Liverpool School of Tropical Medicine durchgeführt; einige Untersuchungen fanden am Departamento de Bioquimica am Instituto Butantan, São Paulo, statt.

4.1.2. Ermittlung der Toxizität der Pflanzenextrakte

Um eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch unerwünschte Wirkungen der Pflanzenextrakte auszuschließen, wurde die **minimale letale Dosis eines Pflanzenextraktes (MLD**) ermittelt.

Die minimale letale Dosis eines Pflanzenextraktes ist definiert als diejenige Dosis, durch die der Tod aller Versuchstiere innerhalb von 24 Stunden hervorgerufen wird. Dazu wurden jeweils fünf männlichen CFW-Mäusen (18-20 g) verschiedene Mengen des Extraktes gelöst in 0,1 ml isotoner Kochsalzlösung i.v. injiziert.

Tabelle 17: MLD der Pflanzenextrakte

Pflanzenextrakt	MLD [mg/Maus]
Calendula officinalis	>10
Scorzonera hispanica[1]	>25

[1] gelöst in DMSO

Die bei den folgenden Versuchen eingesetzten Mengen an Pflanzenextrakt überschreiten diese Werte nicht. Deshalb kann von der Unbedenklichkeit der Pflanzenextrakte ausgegangen werden.

4.1.3. Ermittlung der mittleren letalen Dosis der Schlangengifte

Die **mittlere letale Dosis (LD_{50})** eines Schlangengiftes wurde durch Injektion verschiedener Giftmengen, jeweils gelöst in 0,2 ml isotoner Kochsalzlösung, in die Schwanzvene von männlichen CFW-Mäusen (18-20 g) bestimmt. Pro Dosis wurden fünf Bestimmungen durchgeführt. Die Anzahl der Versuchstiere, die 24 Stunden nach der Injektion gestorben waren, wurde festgestellt und die mittlere letale Dosis (LD_{50}) mit Hilfe der Probit-Analyse bestimmt.

Die Probit-Analyse ist ein statistisches Modell, mit der die Wahrscheinlichkeit einer bestimmten Reaktion in Abhängigkeit von der Dosis bestimmt werden kann [153].

Tabelle 18: LD_{50} der Schlangengifte

Gift	LD_{50} [µg/Maus]
Echis leucogaster	53,22
Naja kaouthia	5,62

Es ist hier deutlich zu sehen, daß die LD_{50}-Werte dieser beiden Schlangenarten differieren. Der Hauptgrund dafür dürfte im unterschiedlichen Wirkungsmechanismus der Gifte und damit der Letalitätswirkung liegen. Während die Sandrasselotter, wie eingangs ausführlich beschrieben, vorwiegend Hämorrhagien auslöst und der Tod durch hämorrhagischen Schock

aufgrund der entstehenden Verbrauchskoagulopathie eintritt, ist das Gift von *Naja kaouthia*, einer Kobraart, neurotoxisch.

4.1.4. Ermittlung der neutralisierenden Wirkung eines Antidots

Die Dosis eine Antidots (eines Pflanzenextraktes oder einer isolierten Verbindung), welche die letale Wirkung eines Schlangengiftes neutralisiert, bezeichnet man als die **mittlere effektive Dosis ED_{50}**:

Die mittlere effektive Dosis einer Probe ist definiert als diejenige Dosis, bei der 50% aller Versuchstiere innerhalb von 24 Stunden nach i.v. Injektion einer Mischung aus der jeweiligen Probe und einer letalen Giftkonzentration überleben.

Tabelle 19: ED_{50}-Resultate
Probe $\times$ 2 ED_{50} *Echis leucogaster*

Probe	ED_{50} [µg/Maus]
Calendula officinalis herba-Rohextrakt	482
Scorzonera hispanica radix-Rohextrakt	979
Petrolether-Teilextrakt aus *C. officinalis*	96
D/E-Teilextrakt aus *C. officinalis*	173
β-Sitosterol/Stigmasterol-Gemisch	>250
β-Sitosterol-O-glucosid	150
β-Carotin	11
Chlorogensäure	28
Kaffeesäure	11
Kämpferol	>44
Rutin	>1000

Außerdem wurde die Wirkung des *C. officinalis*-Rohextraktes auf das Gift von *N. kaouthia* untersucht. Erwartungsgemäß übte der Pflanzenextrakt keine neutralisierende Wirkung auf das neurotoxisch wirkende Kobragift aus. Die mittlere effektive Dosis ED_{50} ist größer als 10 mg/Maus.

4.1.5. Untersuchung der hämorrhagischen Wirkung der Schlangengifte

Die Kenntnis der **minimalen hämorrhagischen Dosis (MHD)** eines Schlangengiftes ist Voraussetzung für die Ermittlung der inhibierenden (antihämorrhagischen) Wirkung eines Antidots.

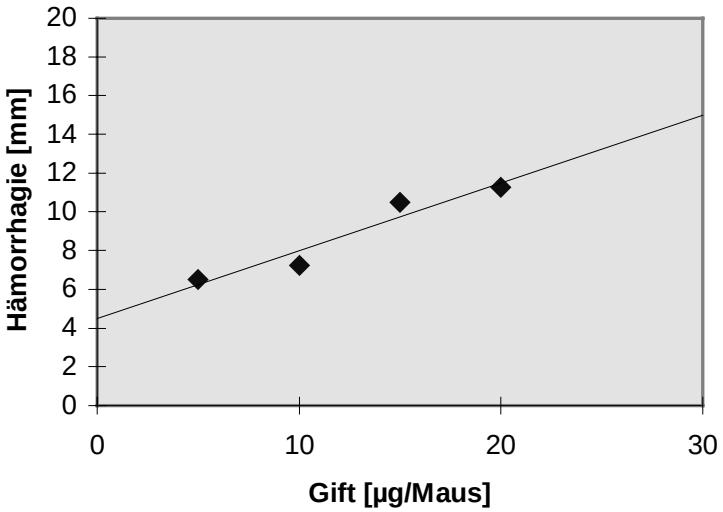
Die minimale hämorrhagische Dosis (MHD) eines Schlangengiftes ist definiert als diejenige Dosis, bei der nach intradermaler Injektion eine Hämorrhagie mit einem Durchmesser von 10 mm innerhalb von 24 Stunden auftritt. Dazu wurden jeweils zwischen 5 µg und 150 µg Gift gelöst in 0,1 ml isotoner Kochsalzlösung intradermal in eine rasierte Hautfläche des Rückens von Ratten oder Mäusen unter leichter Halothan/Sauerstoff-Narkose injiziert. Nach 24 Stunden wurden die Versuchstiere durch Inhalation von Kohlendioxid getötet, die Haut entfernt und mit einem Lineal und mit Hilfe von Hintergrundbeleuchtung die Ausdehnung der geschädigten Hautpartie gemessen.

In Tabelle 20 sind die mit verschiedenen Dosierungen (5 µg bis 20 µg *Echis leucogaster*-Gift) ermittelten Größen der entstandenen Hämorrhagien aufgeführt. Diese Werte wurden in Abhängigkeit von der Giftmenge graphisch dargestellt (Abbildung 26) und durch eine lineare Funktion approximiert. Aus dieser Funktion ergibt sich für eine Hämorrhagie mit einem Durchmesser von 10 mm als minimale hämorrhagische Dosis (MHD) 14,3 µg/Maus für das Gift von *Echis leucogaster*.

Tabelle 20: Ermittlung der MHD für *E. leucogaster*

Dosis [µg/Maus]	Hämorrhagie [mm] (Durchmesser der Hautschädigung)	Mittelwert [mm]
5	6,5 6,5	6,5
10	7,5 7,0	7,25
15	10,5 10,5	10,5
20	11,0 11,5	11,25

Abbildung 26: MHD-Standardkurve für *E. leucogaster*



Für die anderen hämorrhagieauslösenden Gifte wurden die MHD-Werte auf analoge Weise bestimmt.

Tabelle 21: MHD für Schlangengifte

Schlangengift	MHD
Echis leucogaster	14,3 µg/Maus
Bothrops jararaca	91,5 µg/Ratte
Calloselasma rhodostoma	59,0 µg/Ratte
Crotalus atrox	18,2 µg/Ratte
Bitis arietans	18,0 µg/Ratte
Daboia russelii russelii	23,4 µg/Ratte

4.1.6 Ermittlung der antihämorrhagischen Wirkung (IA-MHD) der Pflanzenextrakte

Die größte Anzahl von Versuchen wurde schließlich mit dem Ziel durchgeführt, die antihämorrhagische Aktivität der Pflanzenextrakte und der daraus isolierten Verbindungen zu ermitteln:

Die **inhibierende Aktivität (IA-MHD)** eines Pflanzenextraktes oder einer Substanz ist definiert als diejenige Dosis, welche die minimale hämorrhagische Dosis (MHD) vollständig inhibiert, d.h. es entstehen keine Hämorrhagien innerhalb von 24 Stunden. Zur Ermittlung der IA-MHD wurden jeweils 1 MHD mit verschiedenen Dosen Pflanzenextrakt bzw. Reinsubstanz in 0,1 ml isotoner Kochsalzlösung gelöst, 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend intradermal injiziert. Analog der Ermittlung der MHD wurde die Ausdehnung der geschädigten Hautpartie gemessen.

Pro Antidot waren dazu eine oder mehrere Versuchsreihen notwendig, um die entsprechende Konzentration zu ermitteln. Wenn bei einer bestimmten Probe aufgrund der bisherigen Ergebnisse davon auszugehen war, daß diese Probe daraufhin als „nicht aktiv“ einzustufen ist, wurde in Einzelfällen auf weitere

Versuche zur exakten Ermittlung der IA-MHD verzichtet, wie z.B. bei Rohextrakt aus grünen Tee-Blättern oder bei β-Sitosterol/Stigmasterol.

Abbildung 27: Ergebnisse der IA-MHD-Tests

a) *E. leucogaster* × 0,03 mg *C.officinalis*-Rohextrakt

b) *E. leucogaster* × 0,07 mg *C.officinalis*-Rohextrakt

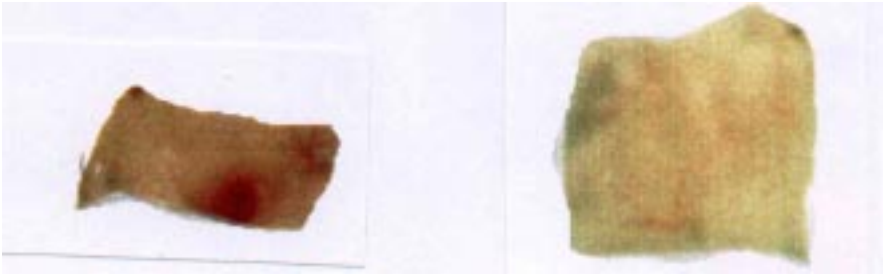
c) *E. leucogaster* × 0,10 mg *C.officinalis*-Rohextrakt

d) *E. leucogaster* × 0,15 mg *C.officinalis*-Rohextrakt

e) +Kontroll-Probe (14,3 µg/Maus *E. leucogaster*)

f) –Kontroll-Probe (nur Extrakt)

27 a **27 b**



27 c **27 d**

27 e **27 f**

Tabelle 22: IA-MHD gegen *Echis leucogaster*

Probe	IA-MHD [µg/Maus]
Calendula officinalis herba-Rohextrakt	100
C. officinalis flores Rohextrakt	250
C. officinalis herba Rohextrakt (nach Aktivkohle)	75
Petrolether-Teilextrakt aus *C. officinalis*	<45
D/E-Teilextrakt aus *C. officinalis*	<100
Methanol-Teilextrakt aus *C. officinalis*	500
Saponinfraktion aus MeOH-Teilextrakt	>500
Rutin	<1000
Kämpferol	90
β-Carotin	40
β-Sitosterol/Stigmasterol-Gemisch	>200
Chlorogensäure	75
Kaffeesäure	50
Chinasäure	50
Esculetin	*
Scorzonera hispanica radix-Rohextrakt	*
Grüner Tee-Rohextrakt	>200

*Meßreihe noch nicht abgeschlossen

Tabelle 23: IA-MHD des *Calendula officinalis*-Rohextraktes gegen weitere Schlangengifte

Schlangengift	IA-MHD [mg Extrakt/Ratte]
Bothrops jararaca	0,6
Calloselasma rhodostoma	0,5
Crotalus atrox	<0,01
Bitis arietans	1,5
Daboia russelii russelii	1,5
Naja kaouthia	ineffektiv

4.1.7. Ergebnisse der *in vivo*-Tests

Die durchgeführten Tests zeigen, daß bestimmte Pflanzenextrakte bzw. daraus isolierte Substanzen gegen Schlangengifte wirksam sein können. Dabei zeigt sich, daß der Extrakt aus der Ringelblume sowohl gegen die letale als auch gegen die hämorrhagische Wirkung des Giftes die besten Ergebnisse aller drei untersuchten Pflanzenextrakte liefert. Der Extrakt aus grünen Tee-Blättern erwies sich als ineffektiv bezüglich der antihämorrhagischen Wirkung und wurde deshalb von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Der Schwarzwurzel-Rohextrakt zeigte gute antihämorrhagische Wirkung, aber die antiletale Wirkung ist schwach. Das bedeutet, daß zwischen den beiden Wirkungen kein zwingender Zusammenhang besteht.

Von den Einzelsubstanzen zeigen β-Carotin, Chlorogensäure, Kaffeesäure und Chinasäure die besten Wirkungen, sowohl bezüglich ihrer Wirkung gegen die letalen als auch gegen die hämorrhagischen Komponenten des Giftes. Dabei werden die Werte der wirksamen Rohextrakte nicht nur reproduziert, sondern sogar übertroffen.

Die Untersuchungen an den Teilextrakten (unpolarer, mittel-polarer und polarer Teilextrakt) zeigten, daß entgegen anfänglichen Vermutungen die Aktivität mehr im unpolaren Teil zu suchen ist. Die Tests mit einzelnen aus dem Methanol-Teilextrakt stammenden Fraktionen wie Saponinen oder Flavonoiden bestätigen die Ergebnisse dieses Rohextraktes.

In der Literatur werden unter anderem folgende aus Pflanzen isolierte Substanzen als gegen Schlangengifte aktiv beschrieben (siehe Abschnitt B-2): Wedelolacton, Sitosterol, Stigmasterol, Tannin, Kämpferol, Protocatechusäure. Die Untersuchungen zu dieser Arbeit bestätigen die Aktivität von Kämpferol. Dagegen erwiesen sich Sitosterin und Stigmasterin als unwirksam sowohl gegen die letale als auch gegen die hämorrhagische Giftwirkung. Suarez-Kurtz et al. isolierten beide Sterine aus *Eclipta prostrata* und wiesen eine neutralisierende Wirkung auf das Gift von *Crotalus durissus terrificus* nach [36].

4.2. *In ovo*-Tests

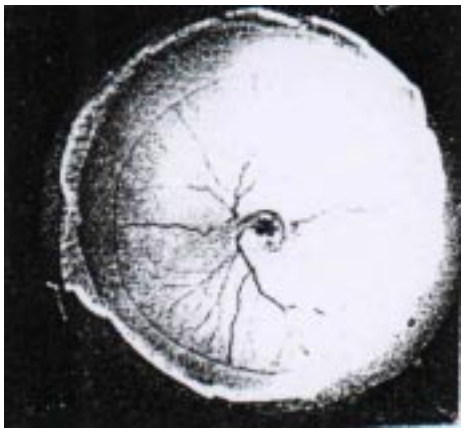
4.2.1. Theoretische Grundlagen

Aussagen über die Wirksamkeit von Antidots gegen Schlangengifte konnten bisher nur durch Tierversuche erbracht werden, da die Vorgänge im Organismus zu komplex sind, um sie auf ein *in vitro*-Modell zu übertragen. Eine Ausnahme stellen dabei nur die Versuche zu Untersuchungen der Koagulationsfähigkeit dar.

1997 gelang es Paula Sells und der Arbeitsgruppe von David Theakston von der Liverpool School of Tropical Medicine, ein *in ovo*-Modell für Hämorrhagietests zu entwickeln [152]. Dabei kann analog zum *in vivo*-Test die entstandene Hämorrhagie gemessen werden. Inzwischen wurde dieses Testsystem auch bei anderen Versuchen mit Schlangengift erfolgreich eingesetzt [154].

Das bebrütete Hühnerei wird schon seit über 100 Jahren als Modell für eine Reihe Untersuchungen toxischer Wirkungen eingesetzt [155,156]. Dabei wird vor allem das extraembryonale Gefäßsystem des Hühnerkeimlings (Dottersack-Gefäßsystem, DGS) verwendet:

Abbildung 28: Gefäßsystem des Hühnerembryos (3.Tag der Bebrütung)



Die Gefäße des DGS gehen vom Embryo aus, verzweigen sich und werden durch den Sinus terminalis begrenzt. Erste Herztätigkeiten werden am 2. Bebrütungstag beobachtet. Der Blutfluß setzt zwischen der 50. und 55. Stunde ein. Damit ist das Blutgefäßsystem früher entwickelt als das Auftreten von intakten Reflexbögen, welche sich nicht vor dem 7. Bebrütungstag schließen, und dem Einsetzen von Schmerzempfindlichkeit des Embryos [157].

4.2.2. Durchführung

Sells et al. haben die Eier am vierten Tag der Bebrütung aus der Schale ausgeschlagen und in eine spezielle Vorrichtung in der Art einer „Hängematte“ aus Polyethylenfolie übergeführt, worin sie noch zwei weitere Tage bebrütet wurden (siehe Abbildung 29):

Abbildung 29: Ei-Test nach Sells [150]

Am siebenten Tag der Bebrütung sollte der Test durchgeführt werden. Dazu wird die Probe auf eine Filterpapierscheibe von 2 mm Durchmesser aufgetragen und diese dann auf ein Blutgefäß des DGS aufgelegt und das Ei weiter bei 37°C gelagert. Nach 2 bis 4 Stunden kann die entstandene Hämorrhagie gemessen werden.

Die beschriebene Vorgehensweise, bei der die Eier aus der Schale geschlagen werden, bringt eine hohe Anzahl von Verlusten mit sich. Die Blutgefäße können beim Aufbrechen der Schale leicht verletzt werden, damit wird das DGS zerstört und das Ei kann nicht mehr für den Test verwendet werden. Außerdem sind die Embryos äußeren Einflüssen ausgesetzt, die sich auf das Versuchsergebnis auswirken können.

Eine Möglichkeit, diese Nachteile zu vermeiden, ist, die Eier nicht in ein separates Gefäß überzuführen, sondern den Test an den Eiern in der Schale vorzunehmen. Diese Variante wurde im Rahmen dieser Dissertation erarbeitet und erfolgreich geprüft. Folgende Vorgehensweise wird vorgeschlagen:

Präparieren der Eier:
Bruteier werden vier Tage bei 38°C in einem Brutschrank bebrütet. Zuerst werden die Eier mit 70%igem Ethanol kurz abgewischt. Mit einer spitzen Pinzette wird ein kleines Loch in den stumpfen Pol des Eies über der Luftblase gebohrt und vorsichtig erweitert. Der Durchmesser sollte die Größe der Luftblase nicht überschreiten. Dann wird die Haut von der Dottersackmembran entfernt und eine Filterpapierscheibe von 2 mm Durchmesser, auf welche zuvor die Probe appliziert wurde, auf ein Blutgefäß aufgelegt.

Messung der Hämorrhagie:
Hämorrhagie oder Inhibierung kann innerhalb von 2 bis 4 Stunden weiterer Bebrütung bei 38°C beobachtet und gemessen werden (Messung mit einem transparenten Lineal).

Durch diese Verbesserung minimieren sich die äußeren Einflüsse auf das Testsystem und auch die Durchführung vereinfacht sich aufgrund des Wegfalls von zusätzlicher Ausrüstung. Außerdem kann der Test mit diesem Modell schon am vierten Tag der Bebrütung erfolgen.

4.2.3. Ermittlung der minimalen hämorrhagischen Dosis (MHD)

Analog zu den *in vivo*-Versuchen ist auch hier die Ermittlung einer MHD notwendig, um die inhibierende Wirkung der Pflanzenextrakte vergleichen zu können. Für die *in ovo*-Tests wurde ausschließlich lyophilisiertes Gift von *Echis leucogaster* (Mali) benutzt.

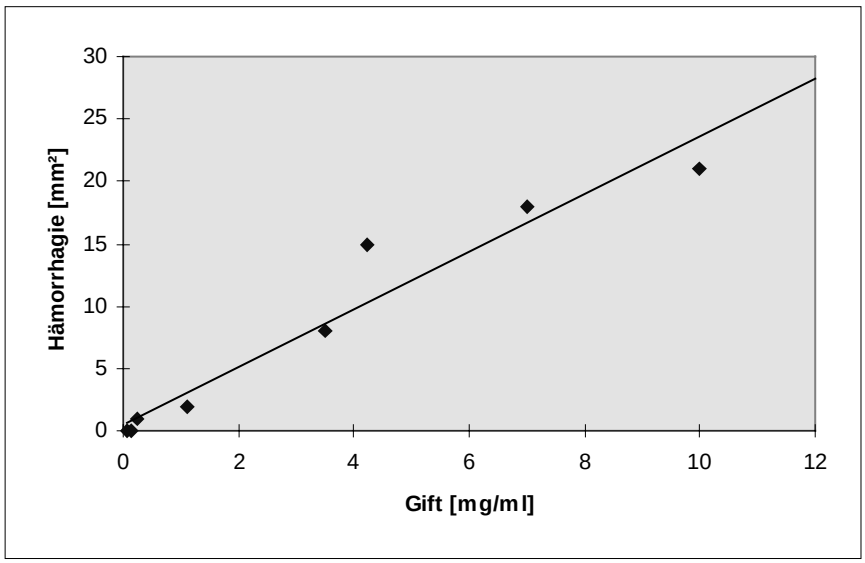
Die *in ovo*-minimale hämorrhagische Dosis (*in ovo*-MHD) ist definiert als die geringste Menge Gift, welche eine Hämorrhagie von 3 mm Durchmesser oder 9 mm² 2 bis 4 Stunden später auslöst. Dazu wurden verschiedene Giftkonzentrationen aufgetragen und die jeweils entstandene Hämorrhagie gemessen. Die Werte sind in Tabelle 24 zusammengefaßt. Aus der

graphischen Auswertung kann die MHD abgelesen werden (siehe Abbildung 30).

Tabelle 24: Ermittlung der in ovo-MHD

Toxinkonzentration [mg/ml]	Hämorrhagie [mm²]
0,0625	0
0,125	0
0,25	1
1,125	2
3,5	8
4,25	15
7,0	18
10,0	21

Abbildung 30: *in ovo*-MHD-Standardkurve für *E. leucogaster*



Analog zur Ermittlung der MHD für die *in vivo*-Versuche (Seite 84) ergibt sich aus der graphischen Darstellung die MHD für die *in ovo*-Tests. Es müssen mindestens 4 mg/ml *E. leucogaster*-Toxin je Ei eingesetzt werden, um eine

Hämorrhagie von 3 mm Durchmesser auszulösen. Diese Giftkonzentration wurde für die Tests mit den Pflanzenextrakten und isolierten Substanzen eingesetzt.

4.2.4. Toxizitätstests

Analog zur Bestimmung der LD_{50}-Werte in den *in vivo*-Tests sollten hier Toxizitätsuntersuchungen darüber Aufschluß geben, inwieweit die eingesetzten Substanzen und Lösungsmittel sowie auch das aufgelegte Filterpapier selbst Schädigungen des Hühnerembryos hevorrufen.

Da sich nicht alle eingesetzten Substanzen gut in H_2O bzw. isotoner Kochsalzlösung lösten, mußten auch organische Lösungsmittel eingesetzt werden. Insgesamt wurden folgende Proben untersucht:

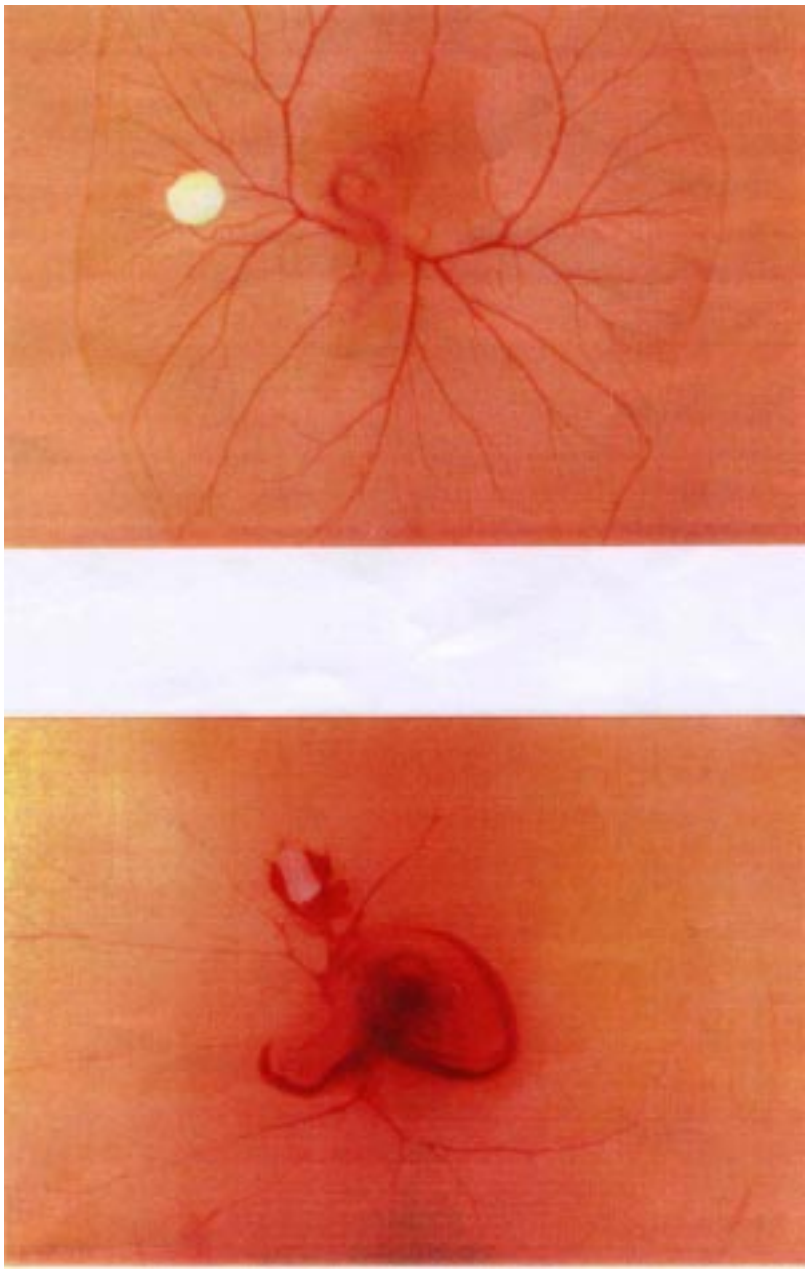
- isotone Kochsalzlösung
- Ethanol 96%
- Dichlormethan
- Chloroform
- DMSO
- *Calendula officinalis* herba-Rohextrakt[1]
- *Scorzonera hispanica* radix-Rohextrakt[1]
- Scopoletin[1]

[1]jeweils 5 mg/ml gelöst in isotoner Kochsalzlösung

1,5 µl jeder Probe wurden jeweils unverdünnt auf eine Filterpapierscheibe von 2 mm Durchmesser aufgetragen und diese analog den übrigen Tests auf ein Blutgefäß des DGS aufgelegt. Die Eier wurden weitere insgesamt 48 Stunden bei 38°C bebrütet und in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Bei keiner Probe zeigte sich eine Veränderung. Deshalb kann davon ausgegangen werden, daß weder die Lösungsmittel noch die untersuchten Pflanzenextrakte und Substanzen das Testsystem beeinflussen.

4.2.5. Ergebnisse der *in ovo*-Tests

Abbildung 31: *in ovo*-Test
oberes Foto:
5,0 mg/ml *C. officinalis* herba-Rohextrakt × MHD E. *leucogaster*
unteres Foto:
+Kontrollprobe (MHD *Echis leucogaster)*



Der *in ovo*-Test auf antihämorrhagische Aktivität eines Antidots wurde im Rahmen vorliegender Dissertation als screening-Methode genutzt, um festzustellen, ob eine Probe aktiv ist oder nicht. Da jeweils die gleiche Menge Substanz (Antidot) für den Test eingesetzt wurde, konnten die Proben untereinander verglichen werden. Testreihen mit den einzelnen Substanzen zur Ermittlung der genauen IA-MHD wurden nicht durchgeführt, da die Ergebnisse des screenings bereits ausreichende Rückschlüsse auf die Wirksamkeit erlaubten und sich die Ergebnisse weitgehend mit den *in vivo* erzielten deckten.

In den Tabellen 25a bis c sind die Ergebnisse der *in ovo*-Versuche zur Ermittlung der antihämorrhagischen Aktivität von Roh- und Teilextrakten, isolierten Substanzen sowie Vergleichssubstanzen aus *Calendula officinalis* und *Scorzonera hispanica* zusammengefaßt.

Tabelle 25 a: Rohextrakte

Probe	Hämorrhagie [mm²]
C. officinalis herba-Rohextrakt	1,5
C. officinalis flores-Rohextrakt	7,5
C. officinalis CO_2-Rohextrakt[1]	0
S. hispanica radix-Rohextrakt	1,7
S. hispanica radix (geschält)	0
S. hispanica herba-Rohextrakt	9,0

[1] Dieser Extrakt wurde von der Fa. Naturwaren Dr. Theiss OHG, Homburg, aus Ringelblumenblüten durch Extraktion mit überkritischem CO_2 hergestellt. Für die Bereitstellung dieser Probe danke ich Prof. H. Becker, Universität Saarbrücken.

Tabelle 25 b: Teilextrakte und Fraktionen

Probe	gelöst in	Hämorrhagie [mm²]
C. officinalis:		
Petrolether-Teilextrakt	Ethanol	1,6
PE 2	Ethanol	5,5
PE 3	Ethanol	6,8
PE 4	Ethanol	1,5
PE 5	Ethanol	6,8
PE 6	Ethanol	7,5
PE 7	Ethanol	2,5
PE 8	Ethanol	7,0
D/E-Teilextrakt	Ethanol	0
DE 1	Ethanol	5,5
DE 2	Ethanol	6,0
DE 3	Ethanol	3,0
DE 4	Ethanol	3,0
DE 5	Ethanol	1,1
DE 6	Ethanol	3,0
DE 7	Ethanol	9,0
S. hispanica:		
Petrolether-Teilextrakt	Ethanol/$CHCl_3$ 1:1	3,5
Methanol-Teilextrakt	Ethanol	4,5
H_2O-Teilextrakt	H_2O	9,0

Tabelle 25 c: Inhaltsstoffe aus *C. officinalis* und *S. hispanica*

Probe	gelöst in	Hämorrhagie [mm²]
β-Sitosterol/Stigmasterol **1**/**6**	Ethanol/$CHCl_3$ 1:1	4,7
Oleanolsäure	Ethanol/$CHCl_3$ 1:1	4,8
Ursolsäure	Ethanol/$CHCl_3$ 1:1	7,5
Linalool	Ethanol/CH_2Cl_2 1:2	5,5
Faradiol	Ethanol/$CHCl_3$ 1:1	5,2
Faradiolmonoester	Ethanol/$CHCl_3$ 1:1	6,4
α-Amyrin **11**	Ethanol/CH_2Cl_2 1:1	9,0
3-Acetoxy-ursen **9**	Ethanol/$CHCl_3$ 1:1	7,5
3-Oxy-ursen **10**	Ethanol/$CHCl_3$ 1:1	6,1
Ursenyl-linolenat **12**	Ethanol/$CHCl_3$ 1:1	9,0
Caryophyllen	Ethanol/CH_2Cl_2 1:2	5,2
β-Carotin	Ethanol	4,5
β-Carotin 2fache Dosis	Ethanol	3,3
α-Tocopherol	Ethanol	8,4
Kämpferol	Ethanol	3,9
Rutin **5**	Ethanol/DMSO 1:1	7,5
Quercetin	DMSO	5,0
Zimtaldehyd	H_2O	9,0
Chlorogensäure **8**	Ethanol	4,2
Chinasäure	Ethanol	0
Kaffeesäure	Ethanol	4,2
trans-Zimtsäure	Ethanol	0
Bernsteinsäureverbindung **4**	Ethanol	9,0
3,5-Dihydroxybenzoesäure	H_2O	0
2,5-Dihydroxybenzoesäure	H_2O	0
Esculetin	Ethanol	2,9
Umbelliferon	Ethanol	3,0

4.3. Vergleich *in vivo - in ovo*

Um die einzelnen *in vivo* und *in ovo* erzielten Ergebnisse konkret miteinander vergleichen zu können, ist es erforderlich, auch die genauen *in ovo*-MHD-Werte zu ermitteln. Darauf wurde jedoch unter der gegebenen Zielsetzung für die Vielzahl der untersuchten Proben verzichtet.

Allerdings wurde die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der beiden Hämorrhagietests mit dem *Calendula officinalis*-Rohextrakt nachgewiesen [152]. Es wurde verglichen, wieviel Extraktlösung erforderlich ist, um jeweils eine MHD zu neutralisieren:

Tabelle 26: Vergleich *in vivo*- und *in ovo*-IA-MHD

	Calendula officinalis-Rohextrakt (100 mg/ml)	
Toxin	Maus	Ei
Echis leucogaster	1,5 µl	0,10 µl
Echis pyramidum leakeyi	2,0 µl	0,15 µl
Echis ocellatus	3,0 µl	0,30 µl

E. leucogaster (Mali), 1 MHD = 14,3 µg/Maus bzw. 1 µg/Ei,
E. pyramidum leakeyi (Kenia), 1 MHD = 8,0 µg/Maus bzw. 1 µg/Ei
E. ocellatus (Nigeria), 1 MHD = 8,6 µg/Maus bzw. 1 µg/Ei.

Die Werte zeigen deutlich, daß zwischen den beiden Methoden Korrelation hinsichtlich der erzielten Ergebnisse besteht. Weitere Untersuchungen mit konventionellen Antiseren als Antidot bestätigen das [152].

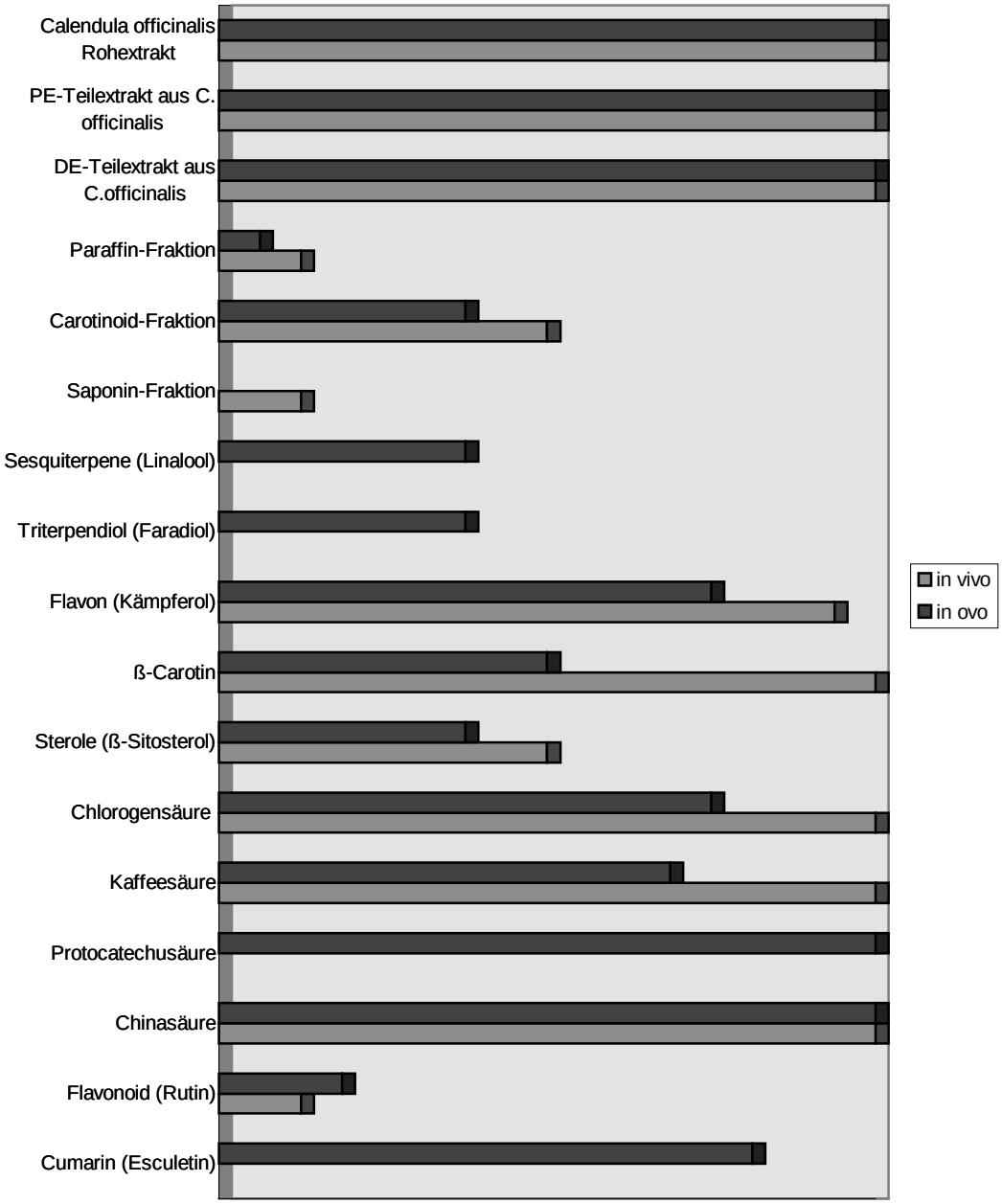
Wie bereits erläutert, diente der Ei-Test (*in ovo*-Test) während dieser Arbeit als Vorversuch, um die antihämorrhagische Aktivität einer Probe abzuschätzen. Das heißt, der Schwerpunkt lag hier vorwiegend auf qualitativen Ergebnissen.

Aus den Werten der Tabellen 25 a bis c kann man direkte Aussagen über die antihämorrhagische Wirksamkeit verschiedener Extrakte, Teilextrakte und Inhaltsstoffe aus *Calendula officinalis* und *Scorzonera hispanica* ableiten. Dabei wird ebenso wie in den *in vivo*-Tests deutlich, daß die polaren Teilextrakte nicht aktiv sind. Einige Substanzen, auf die in Kapitel 5 näher eingegangen wird, erwiesen sich als so aktiv, daß sie in der für die Tests angesetzten Konzentration von 3 mg/ml die Entstehung von Hämorrhagien vollständig verhinderten. Von den aus den Pflanzenextrakten direkt isolierten Verbindungen 1 bis 12 war - mit Ausnahme von Chlorogensäure 8 - keine Verbindung als wirksam einzustufen.

Da β-Carotin in den *in vivo*-Tests mit einer IA-MHD von 40 µg/Maus sehr gute Ergebnisse lieferte (vgl.: *C. officinalis*- Rohextrakt 100 µg/Maus), *in ovo* in der für alle Proben gleich eingesetzten Konzentration von 3 mg/ml dagegen Hämorrhagien von durchschnittlich 4,5 mm² entstanden, wurde überprüft, ob man durch eine Dosissteigerung die Wirkung verbessern kann. Die Versuche ergaben für die doppelte Konzentration (6 mg/ml) β-Carotin nur noch eine durchschnittliche Hämorrhagie von 3,3 mm², also eine deutlich bessere Wirkung. Durch weitere Versuche mit entsprechen höheren Dosierungen ist es möglich, diejenige Dosis zu ermitteln, ab der die Entstehung von Hämorrhagien vollständig unterbunden wird, d.h. die IA-MHD. Dieses Prinzip läßt sich ebenso auf alle übrigen Proben übertragen, wobei die Frage aufgeworfen wird, ob diejenigen Proben, die in der untersuchten Konzentration absolut keine Aktivität aufwiesen (z.B. α-Amyrin), in höherer Dosis wirksam sind.

Sie folgende Graphik zeigt einen qualitativen Vergleich der *in vivo*- mit den *in ovo*-Ergebnissen und verdeutlicht dabei noch einmal die unterschiedliche antihämorrhagische Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen:

Antihämorrhagische Wirksamkeit verschiedener Proben *in vivo* - *in ovo*



4.4. pH-Einflüsse bei den biologischen Tests

Die Substanzen, die *in vivo* und vor allem *in ovo* die größte antihämorrhagische Wirksamkeit erzielt haben, sind organische Säuren. Diese Aussage wirft natürlich die Frage auf, ob bzw. inwieweit der pH-Wert dieser Proben eine Rolle spielt. Theoretisch wäre denkbar, daß aufgrund einer Denaturierung der Proteine des Schlangengiftes im sauren Milieu die Hämorrhagieentstehung unterbunden ist.

Deshalb wurde *in vivo* untersucht, ob es einen für das Schlangengift kritischen pH-Wert gibt. Isotone Kochsalzlösung mit einem pH-Wert von 5,3 wurde mit Citronensäure versetzt, um den pH-Wert zu erniedrigen. 83,5 µl der verschiedenen pH-Lösungen wurden dann jeweils mit 16,5 µl Gift (entspricht 2 LD_{50}) gemischt und nach 30 min Inkubation bei 37°C i.v. in Mäuse injiziert. Die Anzahl der nach 24 Stunden überlebenden Mäuse wurde ermittelt.

Tabelle 27: pH-Einfluß auf das Gift von *E. leucogaster* (10 mg/ml)

pH-Wert	Anzahl der überlebenden Mäuse/gesamt
2,0	2/2
2,5	2/2
3,0	3/3
3,5	0/3
4,0	0/2
4,5	0/2

Somit liegt der kritische pH-Wert für *E. leucogaster* bei 3,5.

Die pH-Werte der einzelnen *in ovo* getesteten Proben zeigt Tabelle 28:

Tabelle 28: pH-Werte der *in ovo* untersuchten Proben

Probe	pH-Wert 1	pH-Wert 2
Calendula officinalis herba-Rohextrakt	6,58	6,32
Calendula officinalis flores-Rohextrakt	6,90	6,44
Scorzonera hispanica radix-Rohextrakt	7,06	6,25
β-Carotin	4,68	6,14
Linalool	5,90	6,20
Oleanolsäure	6,18	6,21
Ursolsäure	7,39	6,26
Ursenyllinolenat **12**	5,88	6,19
3-Acetoxy-ursen **9**	7,28	6,30
3-Oxo-ursen **10**	7,10	6,31
Faradiol	7,69	6,30
Faradiolmonoester	7,30	6,22
Rutin **5**	8,03	6,39
β-Sitosterol/Stigmasterol **1**/**6**	5,69	6,18
Kämpferol	5,34	6,16
Zimtsäure	4,79	6,10
Chinasäure	3,89	6,02
Kaffeesäure	5,08	6,12
Chlorogensäure **8**	5,01	6,16
3,5-Dihydroxybenzoesäure	5,27	6,19
2,3-Dihydroxybenzoesäure	3,95	5,99
Esculetin	5,85	6,19

pH-Wert 1: pH der reinen Substanz (3 mg/ml) gelöst in isotoner Kochsalzlösung bzw entsprechend der Angaben in Tabelle 23 c

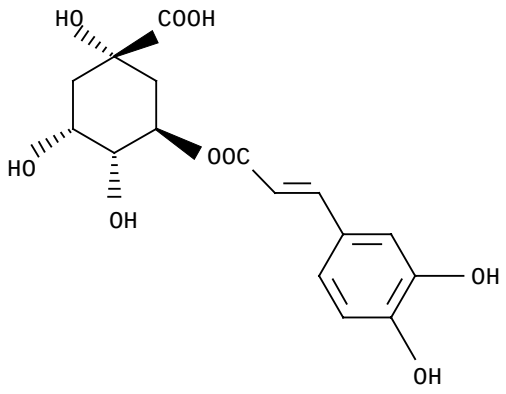
pH-Wert 2: pH des Probengemisches (10 µl Giftlösung + 9 µl isotone Kochsalzlösung + 1 µl Probelösung)

Die Messungen zeigen, daß die pH-Werte aller eingesetzten Substanzen oberhalb des kritischen pH-Wertes von 3,5 liegen. Eine Beeinflussung des Testergebnisse kann deshalb ausgeschlossen werden.

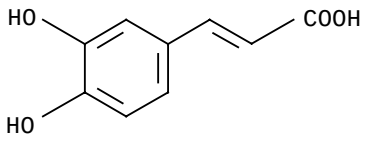
5. Antihämorrhagisch wirksame Substanzen

Aufgrund der Ergebnisse der biologischen Tests kann festgestellt werden, daß nicht nur die Rohextrakte der in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen *Calendula officinalis* und *Scorzonera hispanica*, sondern auch einzelne Inhaltsstoffe aus diesen Pflanzenextrakten eine antihämorrhagische Wirkung besitzen. Einige Substanzen, vor allem einige Fruchtsäuren, reproduzieren die Wirksamkeit der Rohextrakte, während andere etwas geringere Aktivität aufweisen. Andere, vor allem polare Verbindungen, besitzen wiederum überhaupt keine antihämorrhagische Aktivität.

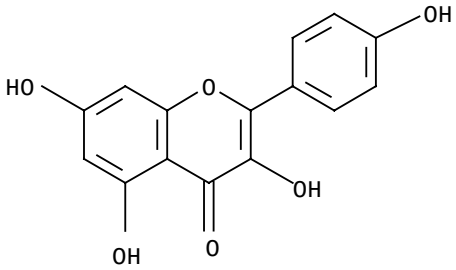
Folgende Substanzen erwiesen sich als aktiv:



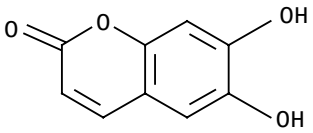
Chlorogensäure



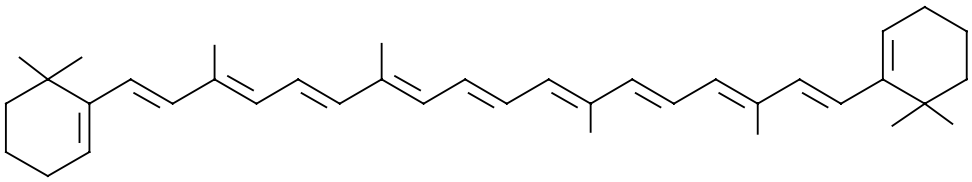
Kaffeesäure



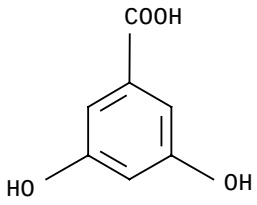
Kämpferol



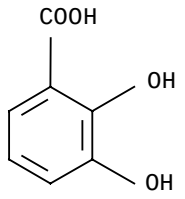
Esculetin



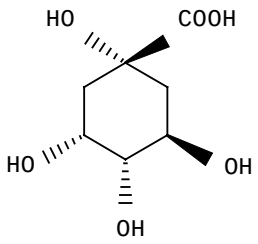
ß-Carotin



3,5-Dihydroxy-
benzoesäure



2,3-Dihydroxy-
benzoesäure



Chinasäure

Es stellt sich die Frage, welches Wirkprinzip diesen Verbindungen zugrunde liegen könnte. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Struktur dürften verschiedenen Mechanismen eine Rolle spielen.

Die o.g. Verbindungen besitzen - mit Ausnahme des β-Carotin - zwei oder mehrere OH-Gruppen. Das heißt, sie sind in der Lage, mit dem Zink der Metalloprotease des Giftes Komplexverbindungen einzugehen und so die Auslösung der Hämorrhagien zu verhindern.

Experimentell wurde diese Komplexbildung in Koagulationstests mit *Echis leucogaster*-Gift untersucht [158]. Dabei wurde verschiedenen Plasmaproben zusätzlich Zink- bzw. Calciumionen in verschiedenen Konzentrationen sowie als

Komplexbildner Theophyllin und Coffein zugesetzt. Die Ergebnisse wiesen eine eindeutige Verlängerung der Koagulationszeit durch den Zusatz von Theophyllin und Coffein auf.

Abbildung 33: Koagulationstest mit Coffeinzusatz zu Blutplasma von Pferden

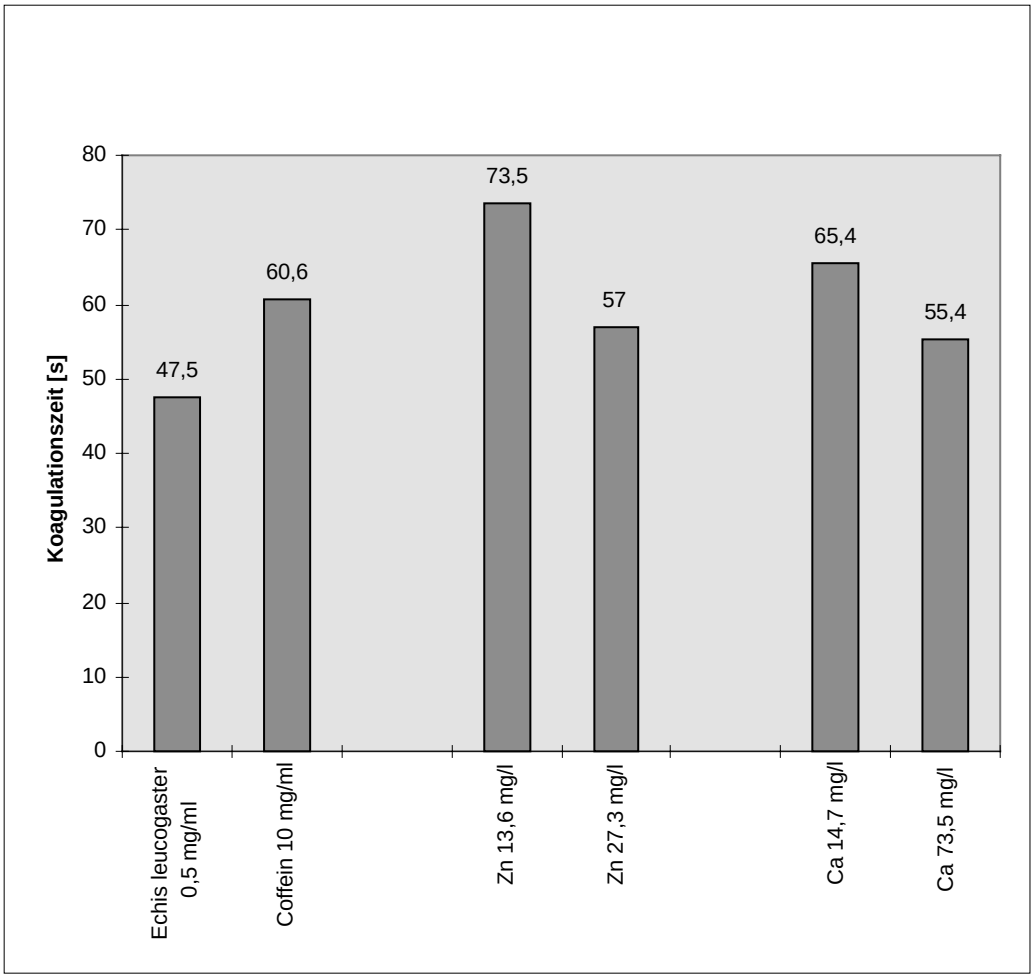


Abbildung 33 zeigt die Veränderung der Koagulationszeiten durch den Zusatz von Coffein zu *Echis leucogaster*-Toxin im Plasma. Die Koagulationszeit verlängert sich von 47,5 s (nur mit Gift) auf 60,6 s (nach Zugabe von Coffein). Wenn zusätzlich eine equivalente Menge Zinkionen (13,6 mg/l) zugegeben wird, verlängert sich die Koagulationszeit auf 73,5 s. Bei Zugabe der doppelten

Menge Zinkionen ist die Koagulationszeit wiederum kürzer, das heißt die zugegebene Menge an Zinkionen überschreitet die Komplexbildungskapazität des Coffeins und das Zink steht wiederum für die enzymatische Wirkung zur Verfügung. Der Effekt mit Calcium ist vergleichbar, obwohl hier der Zusatz einer doppelt equivalenten Menge die Koagulationszeit deutlich verlängert und erst bei höheren Konzentrationen wieder eine Verkürzung der Koagulationszeit zu messen ist.

Diese Versuche bestätigen die Komplexbildungstheorie der aktiven Dihydroxyverbindungen.

Das aktive Prinzip für die Wirksamkeit von β-Carotin hängt dagegen vermutlich mit der wundheilenden Wirkung zusammen, die für Carotinoide aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit Vitamin A vermutet und *in vitro* nachgewiesen wurde [109].

6. Zusammenfassung und Diskussion

In vorliegender Arbeit wurden die Pflanzen *Calendula officinalis*, *Scorzonera hispanica* und *Camellia sinensis* hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe und deren antihämorrhagischen Wirkung gegen Schlangengifte untersucht. Die Ringelblume wird seit langem therapeutisch genutzt, die beiden anderen Pflanzen sind bisher wenig auf ihre pharmakologischen Wirkungen untersucht worden.

Dabei wurde für Isopropanol-Rohextrakte aus *C. officinalis* und *S. hispanica* eine antihämorrhagische Aktivität festgestellt, *C. sinensis* erwies sich als nicht aktiv. Die aktiven Rohextrakte wurden mit dem Ziel, die Einzelsubstanz aus dem Extrakt zu isolieren, die für die beschriebene Wirkung verantwortlich ist, chromatographisch aufgetrennt und charakterisiert. Dazu wurden zunächst Teilextrakte unterschiedlicher Polarität hergestellt und *in vivo* untersucht. Die

unpolaren und mittel-polaren Teilextrakte wiesen dabei eine deutlich höhere Aktivität auf als die polaren Teilextrakte. Parallel zur weiteren chromatographischen Auftrennung der aktiven Teilextrakte wurden die verschiedenen Fraktionen einem *in ovo*-Test zum Nachweis der antihämorrhagischen Aktivität unterzogen. Dieser Test wurde im Rahmen dieser Arbeit für Untersuchungen etabliert und in seiner Durchführung verbessert. Ein weiterer Effekt war, daß durch den Einsatz dieser Methode eine beträchtliche Anzahl von Tierversuchen ersetzt werden konnte und so den Versuchstieren Leid erspart blieb. Darüber hinaus ist die *in ovo*-Methode wesentlich kostengünstiger. Die Kosten für ein Ei sind niedriger als für eine Maus, auch muß weniger dosiert werden.

Die Methode diente als screening, um schnell aktive von nicht aktiven Fraktionen trennen zu können, um so die aktive Substanz einzugrenzen. Da die Extrakte der Pflanzen bereits ausführlich auf ihre chemische Zusammensetzung hin untersucht waren, stellte nicht die Isolierung möglichst vieler Reinsubstanzen das Ziel der Arbeit dar, sondern die Identifizierung der wirksamen Substanz(en). Dadurch konnte der Zeitaufwand für die Untersuchung der Pflanzenextrakte und der daraus isolierten Substanzen reduziert werden.

Ein Vergleich der Extrakte von *S. hispanica* und *C. officinalis*, die beide zur gleichen botanischen Familie Asteracae gehören, zeigt eine erstaunliche Übereinstimmung hinsichtlich des Inhaltsstoffspektrums.

Aus *C. officinalis* wurden zwei neue Verbindungen isoliert, ein Sitoindosid genanntes Sterolderivat sowie ein Bernsteinsäureamid. Aus *S. hispanica* wurde eine Reihe von Verbindungen isoliert, die bisher noch nicht als Inhaltsstoffe dieser Pflanze beschrieben waren. Dabei handelt es sich um Triterpenverbindungen vom Ursen-Typ.

Es konnten mehrere Substanzen ermittelt werden, die eine antihämorrhagische Aktivität aufweisen. Die gemessenen Werte reproduzierten die Werte für die Rohextrakte. Bei den aktiven Verbindungen handelt es sich um β-Carotin,

Dihydroxybenzoesäuren (auch Derivate wie Kaffee- und Chlorogensäure), Flavone und Cumarine.

Es wurde untersucht, ob bei den Pflanzensäuren pH-Einflüsse eine Rolle spielen; dies konnte jedoch ausgeschlossen werden.

Aufgrund der Tatsache, daß die im Schlangengift wirksamen Hämorrhagine Metalloproteasen sind, wurde die Theorie aufgestellt, daß diese Metallionen (im allgemeinen Zn) durch Dihydroxyverbindungen komplexiert und unwirksam gemacht werden könnten. *In vitro*-Versuche auf Grundlage des Koagulationsverhaltens bestätigten den Einfluß einer derartigen Komplexbildung auf die enzymatische Aktivität des Schlangengiftes, weshalb dies eine Erklärung für die Wirkung der aktiven Substanzen darstellt.

Daß die Zusammenhänge trotzdem noch weitaus komplexer sein müssen, beweist die fehlende Aktivität des *C. sinensis*-Extraktes, obwohl darin auch Dihydroxyverbindungen enthalten sind. Möglicherweise ist der Anteil an aktiven Substanzen in diesem Extrakt vergleichsweise geringer, da der Gehalt an Chlorophyll sehr hoch war. Daß dieser Zusammenhang eine Rolle spielt, zeigt ein Vergleich der IA-MHD-Werte von *C. officinalis*-Rohextrakt und dem gleichen Extrakt, nachdem durch Aktivkohle das Chlorophyll entfernt wurde. Nach dieser Behandlung war die Aktivität gestiegen. Trotzdem sind weitere synergistische Effekte innerhalb des Pflanzenextraktes nicht auszuschließen.

Da die Antiserumtherapie bei Bißverletzungen durch Schlangen wie die Sandrasselotter die Entstehung von Hämorrhagien nicht verhindern kann, wäre es sinnvoll, ein pflanzliches Mittel zu entwickeln und als 1. Hilfe-Maßnahme einzusetzen. Darüberhinaus könnte es eine preiswerte Alternative sein, so daß sich auch die Einheimischen der betroffenen Regionen, denen die konventionellen Therapiemöglichkeiten meist nicht offenstehen, damit versorgen können. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß ein entsprechendes Medikament entweder auf Basis eines Rohextraktes oder als Einzelsubstanz möglich ist. Untersuchungen beispielsweise sind noch notwendig, um eine geeignete Applikationsmöglichkeit zu finden.

D Experimenteller Teil

1. Herstellung der Pflanzenextrakte und Isolierung der Substanzen

1.1. Pflanzenmaterial

- *Calendula officinalis*: Das getrocknete und zerkleinerte Pflanzenmaterial von *Calendula officinalis* herba (gesamte oberirdische Pflanzenteile) und flores (Blüten) wurde von der Fa. Galke (Gittelde/Harz) geliefert.

- *Scorzonera hispanica*: Frische Schwarzwurzeln (radix) wurden vom Wochenmarkt Hannover bezogen und stammen von der Fa. van Rijn bv (s'Grave, Holland). Das Pflanzenmaterial wurde gesäubert, zerkleinert und gefriergetrocknet. Die Ausbeute an getrocknetem Pflanzenmaterial betrug durchschnittlich 23 % der eingesetzten frischen Pflanze. Ein Teil der Wurzeln wurde vor der weiteren Bearbeitung geschält, um auf diese Weise den Radix-Extrakt in Schale und geschälte Schwarzwurzel aufzutrennen. Sowohl die Schalen als auch die geschälten Pflanzenteile wurden anschließend ebenfalls zerkleinert und gefriergetrocknet. Die oberirdischen Pflanzenteile (herba) stellte das Bundessortenamt, Gartenbauliche Prüfstelle Rethmar, zur Verfügung. Die Blätter wurden zwei Tage bei 40°C getrocknet und anschließend zerkleinert.

- *Camellia sinensis*: Die getrockneten Teeblätter (Herkunftsland China) stammen von der Fa. Teekanne GmbH, Düsseldorf.

1.2. Extraktion

Die Isopropanol-Rohextrakte der drei Pflanzen wurden jeweils auf gleiche Weise durch Mazeration bzw. Perkolation mit Isopropanol hergestellt:

- Mazeration:

Jeweils 200 g des getrockneten Pflanzenmaterials wurden in einer braunen 2,5 l-Glasflasche mit ca. 2 l Isopropanol versetzt und fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Abfiltrieren des Pflanzenmaterials und dem Entfernen des Lösungsmittels am Vakuumrotationsverdampfer (40°C, 137 mbar) wurde ein zähflüssiger Extrakt erhalten.

- Perkolation:

Das in Isopropanol vorgequollene Pflanzenmaterial wurde in ein Perkolatorrohr (Höhe 90 cm, ∅ 6,5 cm) eingefüllt (Drogenfüllhöhe ca. 60 cm), mit Isopropanol aufgefüllt, bis das Pflanzenmaterial vollständig bedeckt war, danach verschlossen und 12 Stunden stehen gelassen. Anschließend wurde mit insgesamt 5 l Isopropanol perkoliert (Abtropfgeschwindigkeit ca. 10 cm^3/min). Der gewonnene Extrakt wurde analog zum Mazerat am Vakuum-rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt.

Ausbeuten (jeweils ausgehend von 200 g getrocknetem Pflanzenmaterial):

Calendula officinalis herba: 11,4 g (5,7 %)
Calendula officinalis flores: 21,8 g (10,9 %)
Scorzonera hispanica radix: 9,5 g (4,7 %)
Scorzonera hispanica radix geschält: 6,4 g (3,2 %)
Scorzonera hispanica radix Schale: 25,2 g (12,6 %)
Scorzonera hispanica herba: 22,0 g (11,0 %)
Camellia sinensis: 69,1 g (34,5 %)

Der *Calendula officinalis*-CO_2-Rohextrakt wurde durch Extraktion gepulverter Blütendroge mit überkritischem CO_2 bei 50°C und 350 bar in quasikontinuierlicher Extraktionsweise von der Fa. Naturwaren Dr. Theiss OHG, Homburg, hergestellt.

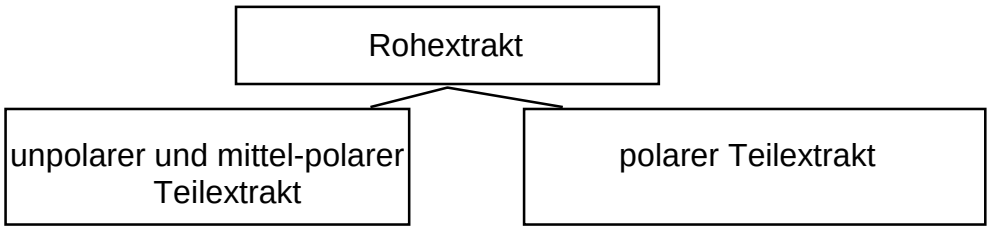
1.3. Auftrennung in Teilextrakte

Zu 10 g des Rohextraktes wurden nacheinander jeweils fünf Portionen von 100 ml Petrolether gegeben, ca. 5 min auf einem Ultraschallbad geschüttelt und die überstehende Lösung abfiltriert. Der Rückstand wurde danach analog mit Diethylether/Essigester 1:1 extrahiert, der danach anfallende Rückstand mit Methanol. Die Filtrate wurden jeweils vereinigt und am Vakuum-rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Ein Schema zu dieser Trennung findet sich für *C. officinalis* im Abschnitt C-3.1.1.(Seite 40) und für *S. hispanica* im Abschnitt C-3.2.1. (Seite 62).

Ausbeuteberechnung (am Beispiel *C. officinalis)*:

Petrolether-Teilextrakt 3,3 g (33 %)
D/E-Teilextrakt 2,7 g (27 %)
Methanol-Teilextrakt 1,8 g (18 %)

Die dünnschichtchromatographische Analyse der Teilextrakte sowie die Auswertung der Spektren der isolierten Verbindungen ergab folgende Zusammensetzung der Teilextrakte (Schema siehe folgende Seite). Interessant ist die weitgehende (qualitative) Übereinstimmung hinsichtlich des Inhaltstoff-spektrums zwischen *C. officinalis* und *S. hispanica*.



vorwiegend fettlösliche Verbindungen:

- Paraffine
- Carotinoide
- Mono- und Sesquiterpene
- Triterpenalkohole
- Steroide
- Phenolcarbonsäuren
- Cumarine
- Flavone
- Chlorophyll und andere

vorwiegend wasserlösliche Verbindungen:

- polare Säuren
- Flavonglykoside
- Saponine
- andere Glykoside
- Zucker und Polysaccharide

1.4. Analytische Daten der isolierten Verbindungen

β-Sitosterol 1

Die Verbindung 1 wurde sowohl aus dem *C. officinalis*- als auch aus dem *S. hispanica*-Extrakt isoliert. Der Petrolether-Teilextrakt von *C. officinalis* wurde durch dry-flash-Chromatographie aufgetrennt. Aus den Fraktionen P4 und P5 fielen 28 mg β-Sitosterol 1 in Form farbloser, nadelförmiger Kristalle aus. Aus dem Petrolether-Teilextrakt aus *S. hispanica* fiel β-Sitosterol beim Einengen an und konnte durch Waschen mit Petrolether und Methanol und anschließender präparativer Dickschichtchromatographie in einer Ausbeute von 24 g gereinigt werden.

Summenformel: $C_{29}H_{50}O$
MG: 414,72 g/mol

F: 136°C
Rf-Wert (FM 1): 0,25
^{1}H-NMR: Tabelle 4 (Seite 42)
^{13}C-NMR: Tabelle 5 (Seite 43), Abbildung 34 (Seite 132)
MS: [M+1]=415, Abbildung 35 (Seite 133)

Sitosterol-3-O-β-D-glucosid 2

Auch dieses Steroid wurde sowohl aus *C. officinalis* als auch aus *S. hispanica* isoliert. Aus *C. officinalis* wurde 2 aus dem DE-Teilextrakt isoliert, der durch dry flash-Chromatographie in die Fraktionen DE 1 bis DE 9 aufgetrennt wurde; aus DE 5 bis 8 fielen 12 mg der Verbindung 2 in weißer, pulverartiger Form an. Aus *S. hispanica* fiel 2 aus dem Dichlormethan-Teilextrakt ebenfalls nach chromatographischer Auftrennung an Kieselgel beim Einengen mit einer Ausbeute von 32 mg als schwach gelbliche Kristalle an.

Summenformel: $C_{35}H_{60}O_6$
MG: 576,86 g/mol
F: 304°C
Rf-Wert (FM 7): 0,85
^{1}H-NMR: Abbildung 37 (Seite 135)
^{13}C-NMR: Tabelle 6 (Seite 46), Abbildung 36 (Seite 134)

(6'-Nonenyl)-sitosterol-3-O-β-D-glucosid 3

Die Verbindung 3 wurde aus dem DE-Teilextrakt von *C. officinalis* durch dry flash-Chromatographie isoliert und mittels präparativer Dickschicht-chromatographie und Säulenchromatographie mit Sephadex LH_{20} gereinigt. Die Ausbeute betrug 6 mg.

Summenformel: $C_{44}H_{72}O_7$
MG: 713,07 g/mol
Rf-Wert (FM 3): 0,52

IR: Abbildung 39 (Seite 139)
^{1}H-NMR: Abbildung 41 (Seite 138)
^{13}C-NMR: Tabelle 7 (Seite 51), Abbildung 40 (Seite 136)
FAB-MS: M^{+}=712 , Abbildung 38 (Seite 136)

Bernsteinsäure-di-amid 4

Diese Verbindung stammt aus der Fraktion DE 8 des DE-Teilextraktes von *C. officinalis* und wurde durch präparative Dickschichtchromatographie, mehrmalige säulenchromatographische Reinigungsschritte sowie Umkristallisation aus Methanol in einer Ausbeute von 4 mg isoliert.

Summenformel: $C_{14}H_{16}O_8N_2$
MG: 340,29 g/mol
Rf-Wert (FM 5): 0,55
IR [cm^{-1}]: 2850, 2700,1712, 1176
^{1}H-NMR: Tabelle 9 (Seite 55), Abbildung 18 (Seite 56)
^{13}C-NMR: Tabelle 10 (Seite 57), Abbildung 43 (Seite 140)
MS: Abbildung 44 (Seite 141)

Rutin 5

Der Methanol-Teilextrakt von *Scorzonera hispanica* wurde durch Säulenchromatographie mit Amberlit XAD-2 aufgetrennt. Die flavonoidhaltigen Fraktionen wurden einer Gelchromatographie mit Sephadex LH_{20} unterzogen, die Verbindung 5 fiel aus Teilfraktionen beim Einengen in einer Ausbeute von 8 mg in Form eines olivgrünen Pulvers an.

Summenformel: $C_{27}H_{30}O_{16}$
MG: 610,51 g/mol

Rf-Wert (FM 7): 0,20
F: 192°C

Chlorogensäure 8

16 mg Chlorogensäure 8 wurde aus dem Methanol-Teilextrakt von *S. hispanica* durch mehrmalige Säulenchromatographie mit Sephadex LH_{20} als schwach gelbliche Kristalle isoliert. Vergleichende Dünnschichtchromatographie lieferte Hinweise darauf, daß die Verbindung 8 auch im Dichlormethan-Teilextrakt enthalten war.

Summenformel: $C_{16}H_{18}O_9$
MG: 354,31 g/mol
Rf-Wert (FM 7): 0,75
F: 204°C
^{1}H-NMR: Tabelle 12 (Seite 67), Abbildung 45 (Seite 142)
^{13}C-NMR: Tabelle 13 (Seite 68), Abbildung 46 (Seite 143)
MS: M^+=354, Abbildung 47 (Seite 141)

3-Acetoxy-urs-12-en 9

Die Verbindung 9 wurde nach Säulenchromatographie mit Kieselgel aus dem Petrolether-Teilextrakt von *S. hispanica* in einer Ausbeute von 115 mg schwach gelblicher Kristalle isoliert.

Summenformel: $C_{32}H_{52}O_2$
MG: 468,79 g/mol
Rf-Wert (FM 1): 0,82
F: 217-218 °C
^{1}H-NMR: Abbildung 48 (Seite 144)
^{13}C-NMR: Tabelle 14 (Seite 70), Abbildung 49 (Seite 145)
MS: Abbildung 50 (Seite 146)

3-Oxo-urs-12-en 10

Die Verbindung 10 wurde nach Säulenchromatographie mit Kieselgel aus dem Petrolether-Teilextrakt von *S. hispanica* als farblose bis schwach gelbliche filmartige Substanz in einer Ausbeute von 13 mg isoliert.

Summenformel: $C_{31}H_{52}$
MG: 424,76 g/mol
Rf-Wert (FM 1): 0,72
IR [cm^{-1}]: 2920, 2860, 1710, 1450, 1380, 1180, 970
^{1}H-NMR: Abbildung 51 (Seite 147)
^{13}C-NMR: Tabelle 15 (Seite 74)
MS: Abbildung 52 (Seite 146)

α-Amyrin 11

Die Verbindung 11 wurde in einer Ausbeute von 38 mg aus dem Petrolether-Teilextrakt von *S. hispanica* durch säulenchromatographische Auftrennung gewonnen und durch Umkristallisation gereinigt.

Summenformel: $C_{30}H_{50}O$
MG: 426,73 g/mol
Rf-Wert (FM 1): 0,48
^{1}H-NMR: Abbildung 53 (Seite 148)
^{13}C-NMR: Tabelle 16 (Seite 76), Abbildung 54 (Seite 149)
MS: [M+] 426, Abbildung 57 (Seite 148)

Urs-12-en-3ß-yl-linoleat 12

Die Verbindung 12 konnte sowohl aus dem Petrolether- als auch aus dem Chloroform-Teilextrakt von *S. hispanica* isoliert werden. Insgesamt wurden nach Reinigung mittels präparativer Dickschichtchromatographie 40 mg der Verbindung 12 als farblose, zähe bis feste Substanz erhalten.

Summenformel: $C_{48}H_{79}O_2$
MG: 688,16 g/mol
Rf-Wert (FM 1): 0,94
^{1}H-NMR: Abbildung 55 (Seite 150)
^{13}C-NMR: Abbildung 56 (Seite 151)
FAB-MS: 688 (5%), 679 (12%), 663 (14%), 424 (15%), 409 (58%), 271 (24%), 231 (29%), 228 (75%), 203 (73%), 189 (70%), 148 (78%), 137 (100%), 133 (68%)

2. Lösungsmittel

Die zur Extraktion und Chromatographie eingesetzten Lösungsmittel Petrolether, n-Hexan, Diethylether, Dichlormethan, Chloroform, Aceton, Essigester, Methanol, Ethanol, Isopropanol, n-Butanol wurden vorwiegend in technischer Qualität bezogen und destilliert eingesetzt. Das für die Dünnschicht- und Dickschichtchromatographie eingesetzte Methanol besaß die Qualität p.A. (Fa. Merck).

Zur Spektroskopie wurden folgende deuterierte Lösungsmittel eingesetzt:
Chloroform-d_1, Aceton-d_6, Methanol-d_4, DMSO-d_6, Pyridin-d_5 (Deuterierungsgrad min. 99,95 % für die Kernresonanzspektroskopie, Uvasol®/Merck).

3. Vergleichssubstanzen und Verbrauchschemikalien

Die für die Herstellung der Sprühreagentien für die Dünnschichtchromatographie benötigten Chemikalien (siehe Abschnitt 3.2.) stammen von den Firmen Fluka, Merck bzw. Sigma.
Für die vergleichende Dünnschichtchromatographie sowie für die biologischen Tests kamen folgende Reinsubstanzen der Fa. Sigma zur Anwendung:
Terpene (Linalool, Oleanolsäure, Ursolsäure), Sterole (Cholesterol, β-Sitosterol, Stigmasterol), (+)-α-Tocopherol, β-Carotin, Flavone (Kämpferol), Flavonoide

(Rutin, Quercetin), Cumarine (Scopoletin, Umbelliferon), Säuren ([-]-Chinasäure, Kaffeesäure, Chlorogensäure, trans-Zimtsäure, Dihydroxy-carbonsäuren).

4. Chromatographie

4.1. Säulenchromatographie

- **dry-flash-Chromatographie**

Als Chromatographiesäule diente eine G3-Glasfritte (Durchmesser 110 mm, Höhe 70 mm), die mit ca. 350 g Flashgel (Kieselgel, Korngröße 0,02 mm, Fa. Merck) trocken gefüllt wurde. Dann wurde die Säule mit Petrolether beschickt und durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuums über die Säule gesaugt, um das Säulenmaterial zu verdichten. Die zu trennenden Extrakte bzw. Substanzen wurden im Verhältnis 1:4 an Flashgel adsorbiert und pulverförmig als gleichmäßige Schicht auf die vorbereitete Säule aufgegeben. Für die chromatographischen Trennungen wurde ein Laufmittelgradient Petrolether $\rightarrow$ Essigester $\rightarrow$ Methanol angewandt. Aus diesen Lösungsmitteln wurden 2-Komponenten-Gemische hergestellt, indem das polarere Lösungsmittel in 5 %-Schritten dem jeweils unpolareren zugesetzt wurde. Von jeder der auf diese Weise erhaltenen Mischungen wurden 3 $\times$ 50 ml nacheinander über die Säule gesaugt.

- **Kieselgel-Säulenchromatographie**

Dazu wurden Glassäulen unterschiedlicher Größe verwendet. Als Füllmaterial diente Kieselgel 60 der Korngröße 230-400 mesh (Fa. Merck), welches mit dem entsprechenden Laufmittel in die Säule eingeschlämmt und mit einer dünnen Schicht aus Seesand abgedeckt wurde. Das zu trennende Substanzgemisch wurde in wenig Elutionsmittel gelöst und auf die Säule aufgegeben. Die

Trennung erfolgte analog der dry-flash-Chromatographie mit einem Lösungsmittelgradienten.

- **Säulenchromatographie mit Adsorberharz**

Zur Fraktionierung der polaren Teilextrakte diente die SC mit Amberlit XAD-2 der Korngröße 0,3 - 1 mm (Fa. Serva). Das Harz wurde zuvor gereinigt. Hierzu wurde das Material mit MeOH und anschließend mit H_2O (pH 2, HCl-Zusatz) bis zur Klarheit des Filtrats gewaschen. Die Füllung der Säule erfolgte durch Einschlämmen des Harzes mit H_2O. Die zu trennenden Fraktionen wurden in wenig H_2O suspendiert auf die Säule aufgegeben. Die Elution erfolgte mit einem $H_2O \rightarrow$ MeOH-Gradienten.

- **Gelchromatographie**

Dazu wurde Sephadex LH_{20} der Fa. Pharmacia verwendet. Vor der Säulenfüllung wurde das Gel in Methanol 12 Stunden lang vorgequollen und dann in die Säule eingeschlämmt. Die Fraktionen bzw. zu trennenden Substanzen wurden in wenig Elutionsmittel gelöst aufgegeben. Die Elution erfolgte mit Methanol mit einer Flußgeschwindigkeit von 2 Tropfen/min, die aufgefangenen Fraktionen betrugen 1-2 ml.

4.2. Dünnschichtchromatographie

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten der Fa. Merck, Kieselgel 60 F_{254} (Schichtdicke 0,2 mm) sowie HPTLC-Fertigplatten RP-18 F_{254} verwendet.

Folgende Fließmittelgemische wurden eingesetzt (Verhältnisangaben beziehen sich auf Volumenanteile):

Tabelle 29: Fließmittelgemische

FM 1	n-Hexan/Essigester 80:20
FM 2	n-Hexan/Essigester 30:70
FM 3	n-Hexan/Essigester 15:85
FM 4	n-Hexan/Essigester/Chloroform 1:1:1
FM 5	Essigester/Chloroform/Methanol 1:1:1
FM 6	Chloroform
FM 7	Chloroform/Methanol/Wasser 61:32:7
FM 8	Essigester/Ameisensäure/Wasser 85:10:15
FM 9	Methanol
FM 10	n-Butanol/Essigsäure/Wasser 40:10:50 (Oberphase)

Als Sprühreagentien wurden eingesetzt [159,160]:

1: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz

Eine Mischung aus 85 ml Methanol und 10 ml Eisessig wird unter Eiskühlung vorsichtig mit 8 ml konz. Schwefelsäure und 0,5 ml Anisaldehyd versetzt. Die getrockneten Chromatogramme werden bis zur beginnenden Transparenz der Schicht besprüht und anschließend 1 bis 15 min bei 90-125°C erhitzt.

2: Schwefelsäure-Reagenz

10 ml konz. Schwefelsäure werden vorsichtig unter Eiskühlung mit ca. 90 ml Methanol vermischt. Die getrockneten Chromatogramme werden gleichmäßig besprüht, mit einem Fön getrocknet und anschließend noch 1-20 min auf 95-140°C erwärmt.

Es resultieren im langwelligen UV-Licht (365 nm) charakteristisch gefärbte Substanzzonen, die oft schon im sichtbaren Licht als farbige Zonen auf farblosem Untergrund erkannt werden können. Schwefelsäure ist ein Universalreagenz, mit dem bei höheren Temperaturen (150-180°C) fast alle Stoffklassen durch Verkohlungsreaktionen nachgewiesen werden können.

3. Ninhydrin-Reagenz

0,3 g Ninhydrin (2,2-Dihydroxyindan-1,3-dion) werden in 95 ml Isopropanol gelöst und mit 5 ml Essigsäure (96 %) versetzt. Die vom Fließmittel befreiten Chromatogramme werden mit dem Reagenz besprüht und anschließend 5-10 min auf 95-120°C erwärmt. Nach 15 min Stabilisierungszeit resultieren für Amine rötliche Substanzzonen auf hellem Untergrund.

4. Berberin-Reagenz

10 mg Berberinchlorid werden in 100 ml Ethanol gelöst. Die vom Fließmittel befreiten Chromatogramme werden homogen mit dem Reagenz besprüht und im Kaltluftstrom getrocknet. Für Sterole und gesättigte Verbindungen resultieren im UV-Licht (254 nm und 365 nm) hellgelb fluoreszierende Zonen auf weniger intensiv fluoreszierendem Untergrund.

5. Diphenylborsäure-2-aminoethylester-Reagenz
(Naturstoffreagenz A nach Neu)

1 g Diphenylborsäure-2-aminoethylester wird in 100 ml Methanol gelöst. Die Chromatogramme werden nach 10 min Erwärmen auf 80°C in einem Exsikkator abgekühlt, mit der Reagenzlösung besprüht, 1 min im Warmluftstrom getrocknet und 15 min im Exsikkator aufbewahrt. Nach etwa 2 min Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (365 nm) resultieren für Flavonoide charakteristische gelb fluoreszierende Substanzzonen.

6. Aluminiumchlorid-Reagenz

0,2 g Aluminiumchlorid werden in 100 ml Ethanol gelöst. Die Chromatogramme werden mit dem Reagenz besprüht und im Kaltluftstrom getrocknet. Für Flavonoide resultieren im Tageslicht schwach gelbe Substanzzonen, die im langwelligen UV-Licht (365 nm) hellblau bis türkisfarbig fluoreszieren.

7. Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz

1 g Vanillin wird in 250 ml Methanol gelöst und mit 25 ml Eisessig und 10 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Die Chromatogramme werden mit der Reagenzlösung besprüht und 5-15 min auf 120-160°C erhitzt. Es entstehen für Sterole und Triterpene sowie für Zucker gefärbte Zonen auf hellem Untergrund.

8. Eisen(III)-chlorid-Reagenz

5 g Eisen(III)-chlorid werden in 100 ml Salzsäure (0,5 mol/l) gelöst. Das Chromatogramm wird nach dem Besprühen im Tageslicht ausgewertet. Phenolische Verbindungen färben sich blau oder grünlich.

4.3. Präparative Dickschichtchromatographie

Für die präparative Dickschichtchromatographie wurde MN-Kieselgel P/UV_{254} der Fa. Macherey-Nagel, Düren, verwendet. Für fünf Platten der Größe 20×20 mm mit 2 mm Schichtdicke wurden ca. 300 g Kieselgel mit 550-600 ml H_2O vermischt und 2 h unter mehrmaligem Schütteln an einer Wasserstrahl-pumpe entgast. Die vorbereiteten Glasplatten wurde mit Hilfe eines Auftragegerätes (Fa. Desaga) mit der Kieselgelsuspension beschichtet, getrocknet und vor der Verwendung 3 h bei 120°C aktiviert.

Für die Entwicklung kamen die entsprechenden Fließmittelgemische der Dünnschichtchromatographie zum Einsatz (siehe Tabelle 26). Zur Detektion wurde die Platte bis auf einen dünnen Randstreifen mit einer Glasplatte abgedeckt und mit dem jeweiligen Sprühreagenz besprüht. Dann wurden die entsprechenden Substanzzonen von der Glasplatte gekratzt, das Kieselgel in einem Erlenmeyerkolben mit Lösungsmittel versetzt und mit einem Magnetrührer extrahiert. Die Lösung wurde anschließend über Blaubandfilter filtriert und zur Trockne eingeengt.

4.4. Reaktionschromatographie

4.4.1. Saure Hydrolyse von Glykosiden

Max. 0,5 mg der zu hydrolisierenden Verbindung wurde als Lösung auf die Startlinie einer Kieselgelplatte (Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten der Fa. Merck) aufgetragen. Die Kieselgelschicht wurde mit einer Glasplatte so abgedeckt, daß nur die Startzone freiblieb, und 24 h in eine DC-Kammer gestellt, in der sich mehrere kleine Bechergläser mit rauchender Salzsäure befanden. Anschließend wurden die Salzsäuredämpfe entfernt (10 min bei 110°C) und die Platte entsprechend den Angaben unter 3.2. entwickelt. Zum Zuckernachweis wurde FM 7 in Verbindung mit dem Sprühreagenz 8 verwendet. Der Nachweis der Aglyka (von Steroiden) gelang mit den unpolareren Fließmittelgemischen 3 und 4 und den Sprühreagenzien 1, 2, 4 und 8.

5. Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Büchi 510-Apparatur bestimmt und als unkorrigierte Werte angegeben.

6. pH-Werte

Sämtliche pH-Werte wurden mit dem pH 330/Set-0 der Fa. WTW, Weilheim, gemessen. Die Proben wurden in isotoner Kochsalzlösung bzw. - wenn sie darin unlöslich waren - in den in Tabelle 23 angegebenen Lösungsmitteln gelöst und bei 20°C vermessen. Der pH-Wert der isotonen Kochsalzlösung betrug 6,0.

7. Spektroskopie

7.1. NMR-Spektroskopie

Alle Spektren wurden mit dem Spektrometer AM 300 der Fa. Bruker aufgenommen. Die Meßfrequenz betrug bei ^{1}H-NMR-Spektren 300 MHz, bei den ^{13}C-NMR-Spektren 75 MHz. Die ^{13}C-NMR-Spektren wurden protonen-entkoppelt und im DEPT-Verfahren aufgenommen.

Als interner Standard diente die chemische Verschiebung der jeweils eingesetzten Lösungsmittel (siehe Tabelle 30) bzw. Tetramethylsilan.

Tabelle 30: ^{1}H- und ^{13}C-NMR-chemische Verschiebungen in deuterierten Lösungsmitteln (δ-Skala, ppm) [161]

Lösungsmittel	^{1}H-NMR		^{13}C-NMR	
Chloroform	7,25	Singulett	77,0	Triplett
Methanol	3,35	Quintett	49,0	Septett
DMSO	2,5	Quintett	39,7	Septett
Pyridin	7,0	Triplett	123,4	Triplett
	7,35	Singulett	135,3	Triplett
	8,5	Singulett	149,8	Triplett

7.2. IR-Spektren

Die Substanzen wurden als Film auf NaCl mit einem Spektrometer IFS 88 der Fa. Bruker vermessen.

7.3. Massenspektren

- Niederauflösung: Spektrometer Finnigan MAT 312 (EI 70 eV, Direkteinlaß)
- FAB-MS: VG Autospec

Die Proben wurden vor Aufnahme der Massenspektren 4-6 h am Ölpumpenvakuum getrocknet.

8. *In vivo*-Tests

- **Ermittlung der minimalen letalen Dosis (MLD)**

Die minimale letale Dosis einer Probe ist definiert als diejenige Dosis, durch die der Tod aller Versuchstiere innerhalb von 24 Stunden hervorgerufen wird. Dazu werden jeweils fünf männlichen CFW-Mäusen (18-20 g) verschiedene Mengen des Extraktes gelöst in 0,1 ml isotoner Kochsalzlösung i.v. injiziert.

- **Ermittlung der mittleren letalen Dosis (LD_{50})**

Die mittlere letale Dosis (LD_{50}) eines Schlangengiftes wird durch Injektion verschiedener Giftmengen, jeweils gelöst in 0,2 ml isotoner Kochsalzlösung, in die Schwanzvene von männlichen CFW-Mäusen (18-20 g) bestimmt. Pro Dosis werden fünf Bestimmungen durchgeführt. Die Anzahl der Versuchstiere, die 24 Stunden nach der Injektion gestorben sind, wird festgestellt und die mittlere letale Dosis (LD_{50}) mit Hilfe der Probit-Analyse bestimmt.

- **Ermittlung der mittleren effektiven Dosis (ED_{50})**

Die mittlere effektive Dosis einer Probe ist definiert als diejenige Dosis, bei der 50% aller Versuchstiere innerhalb von 24 Stunden nach i.v. Injektion einer Mischung aus der jeweiligen Probe und einer letalen Giftkonzentration überleben.

- **Ermittlung der minimalen hämorrhagischen Dosis (MHD)**

Die minimale hämorrhagische Dosis (MHD) eines Schlangengiftes ist definiert als diejenige Dosis, bei der nach intradermaler Injektion eine Hämorrhagie von 10x10 mm innerhalb von 24 Stunden auftritt. Dazu werden jeweils zwischen 5 µg und 150 µg Gift gelöst in 0,1 ml isotoner Kochsalzlösung intradermal in eine rasierte Hautfläche des Rückens von Ratten oder Mäusen unter leichter Halothan/Sauerstoff-Narkose injiziert. Nach 24 Stunden werden die Versuchstiere durch Inhalation von Kohlendioxid getötet, die Haut entfernt und mit einem Lineal und mit Hilfe von Hintergrundbeleuchtung die Ausdehnung der geschädigten Hautpartie gemessen.

- **Ermittlung der inhibierenden Aktivität einer Probe gegen Hämorrhagien (IA-MHD)**

Die inhibierende Aktivität (IA-MHD) eines Pflanzenextraktes oder einer Substanz ist definiert als diejenige Dosis, welche die minimale hämorrhagische Dosis (MHD) vollständig inhibiert, d.h. es entstehen keine Hämorrhagien innerhalb von 24 Stunden. Zur Ermittlung der IA-MHD werden jeweils 1 MHD mit verschiedenen Dosen Pflanzenextrakt bzw. Reinsubstanz in 0,1 ml isotoner Kochsalzlösung gelöst, 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend intradermal injiziert. Analog der Ermittlung der MHD wirde die Ausdehnung der geschädigten Hautpartie gemessen.

Die ermittelten Ergebnisse der *in vivo*-Tests stellen - soweit nicht anders angegeben - Mittelwerte zweier Parallelbestimmungen dar. Pro Versuchsreihe wurde jeweils eine (+)-Kontrollprobe (isotone Kochsalzlösung anstelle von Antidot) sowie eine (-)-Kontrollprobe (nur isotone Kochsalzlösung) mitbestimmt.

9. *In ovo*-Tests

- **Präparieren der Eier**

Bruteier (Fa. Lohmann, Cuxhaven) werden vier Tage bei 38°C in einem Brutschrank bebrütet. Zuerst werden die Eier mit 70%igem Ethanol kurz abgewischt. Mit einer spitzen Pinzette wird ein kleines Loch in den stumpfen Pol des Eies über der Luftblase gebohrt und vorsichtig erweitert. Der Durchmesser sollte die Größe der Luftblase nicht überschreiten. Dann wird die Haut von der Dottersackmembran entfernt und eine Filterpapierscheibe von 2 mm Durchmesser, auf welche zuvor die Probe appliziert wurde, auf ein Blutgefäß aufgelegt.

- **Messung der Hämorrhagie**

Hämorrhagie oder Inhibierung kann innerhalb von 2 bis 4 Stunden weiterer Bebrütung bei 38°C beobachtet und gemessen werden (Messung mit einem transparenten Lineal).

- **Ermittlung der minimalen hämorrhagischen Dosis (in ovo-MHD)**

Die *in ovo*-minimale hämorrhagische Dosis (*in ovo*-MHD) ist definiert als die geringste Menge Gift, welche eine Hämorrhagie von 3 mm Durchmesser oder 9 mm² 2 bis 4 Stunden später auslöst. Dazu wurden verschiedene Giftkonzentrationen aufgetragen und die jeweils entstandene Hämorrhagie gemessen.

Die Werte der *in ovo*-Tests stellen Mittelwerte aus im allgemeinen vier Parallelproben dar. Pro Versuchsreihe wurde eine (+)-Kontrollprobe (isotone Kochsalzlösung anstelle von Antidot) sowie eine (-)-Kontrollprobe (nur isotone Kochsalzlösung) untersucht.

E Anhang

Spektren der isolierten Verbindungen

Abbildung 34: ^{13}C-NMR-Spektrum von β-Sitosterol 1 in $CDCl_3$

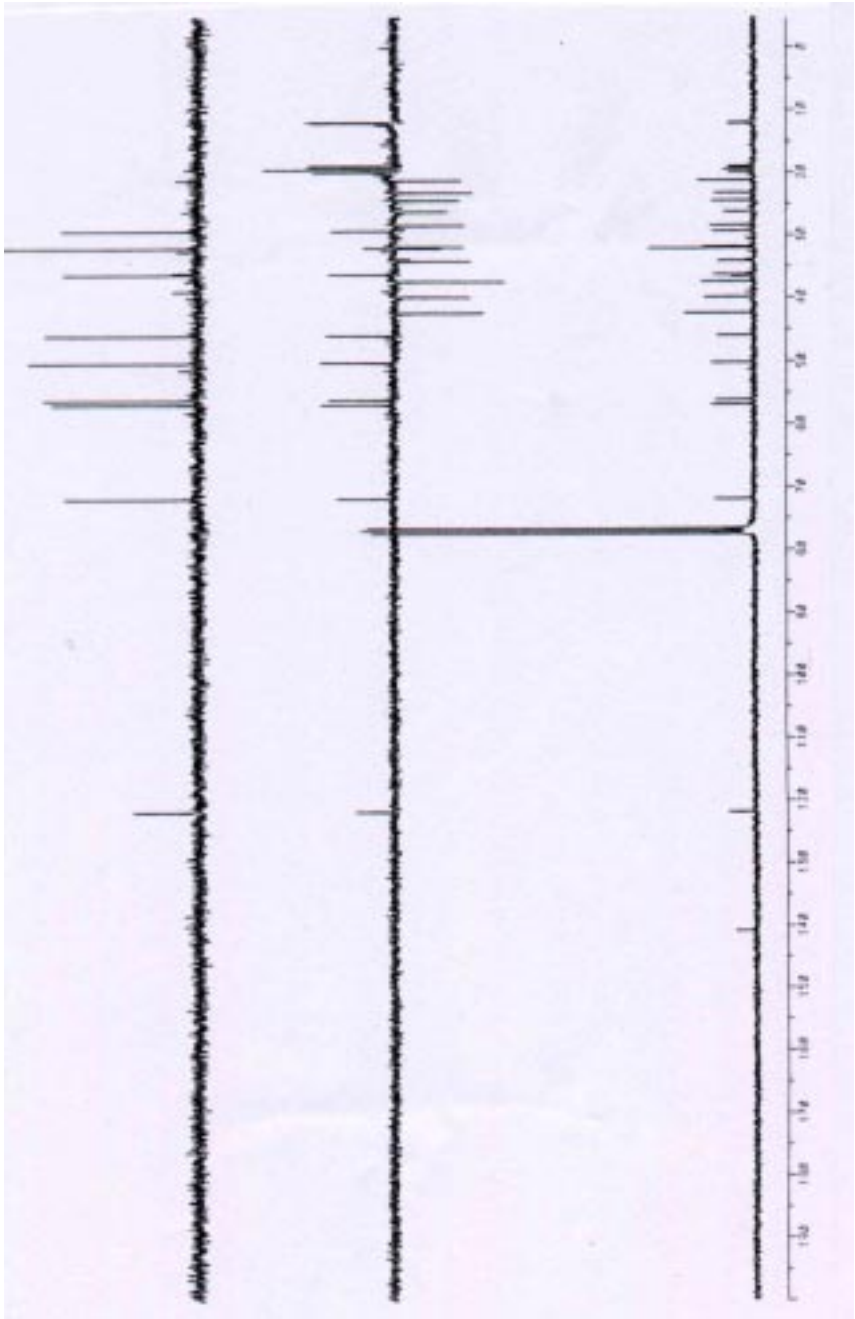


Abbildung 35: Massenspektrum von β-Sitosterol 1

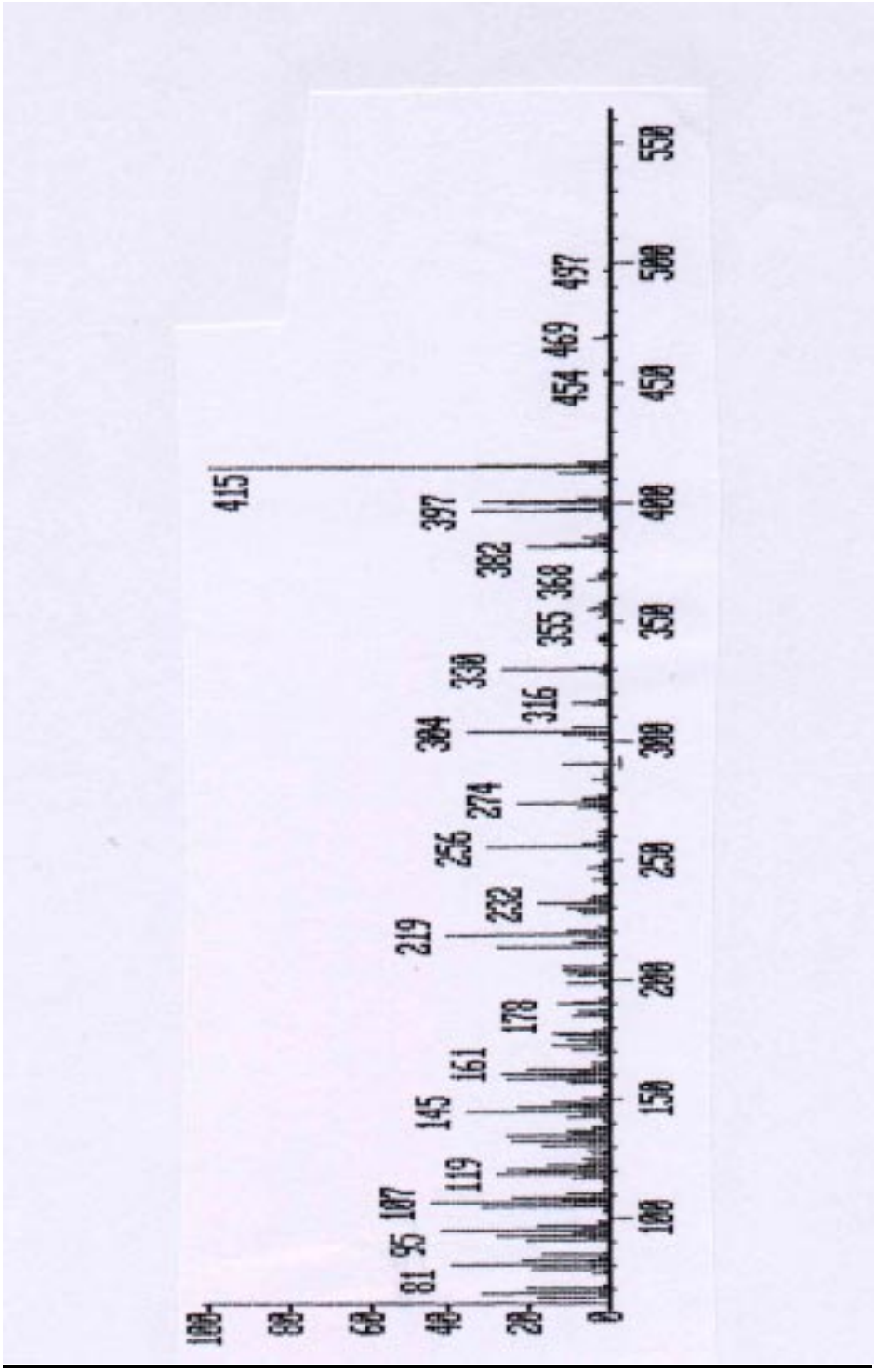


Abbildung 36: ^{13}C-NMR-Spektrum von Sitosterol-3-O-β-D-glucosid 2 in Pyridin-d_6

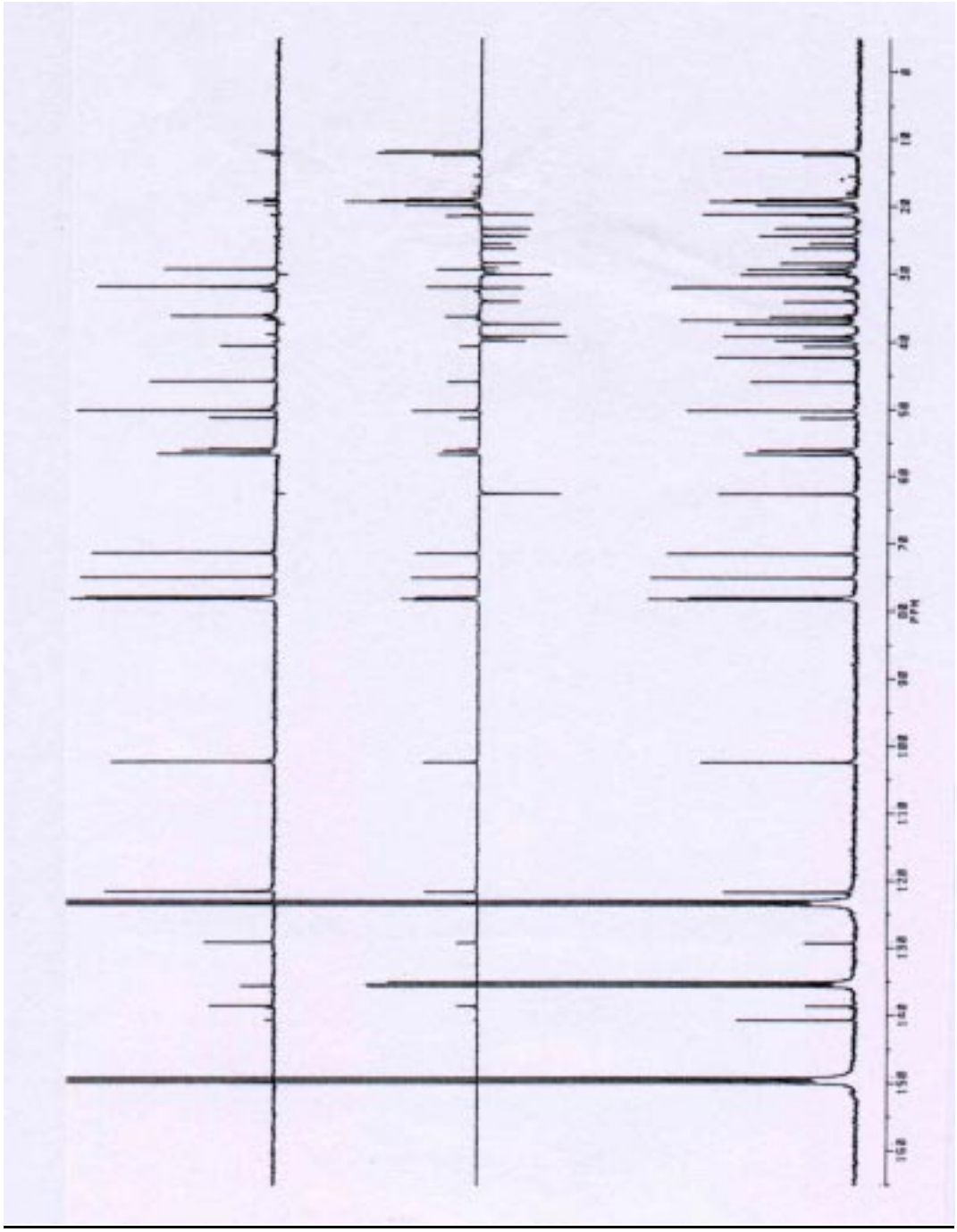


Abbildung 37: ^{1}H-NMR-Spektrum von Sitosterol-3-O-β-D-glucosid 2 in Pyridin-d_6

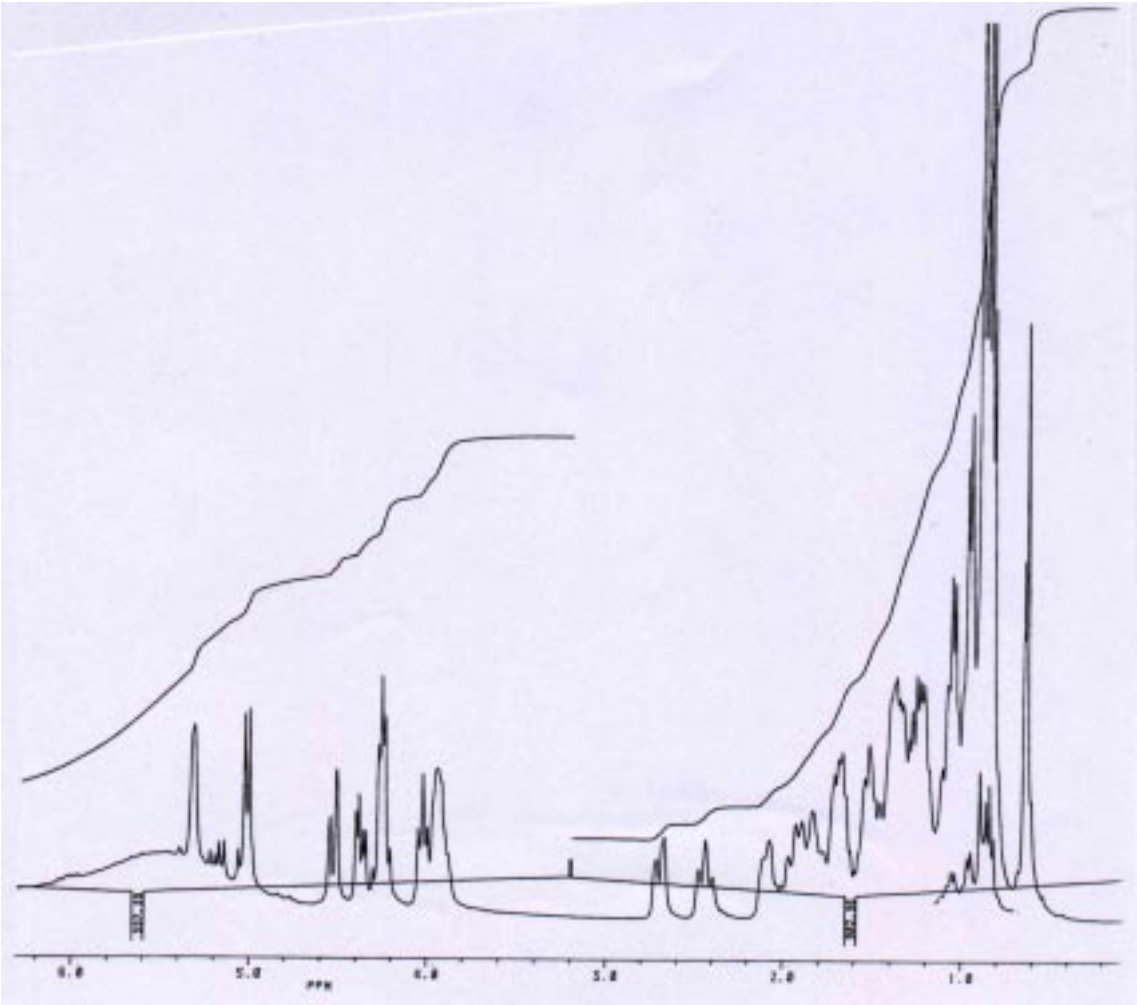


Abbildung 38: Massenspektrum der Verbindung 3

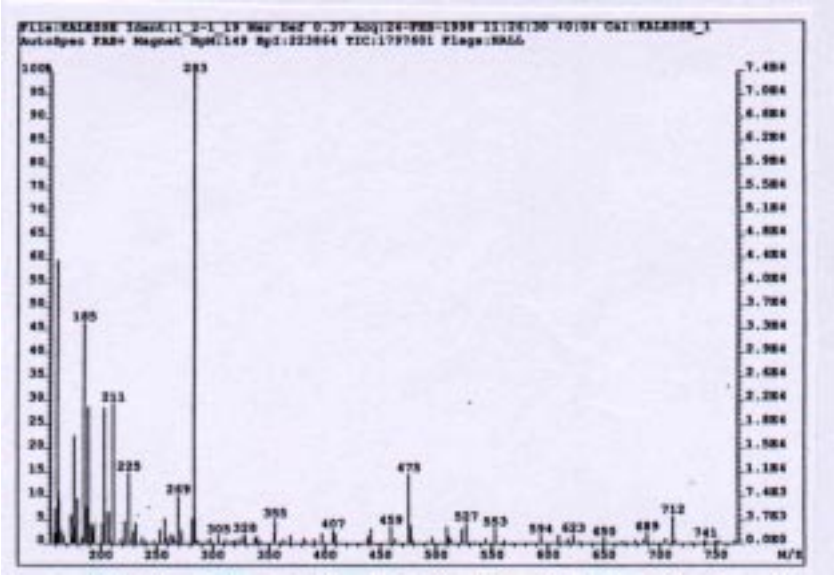


Abbildung 40: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung 3 in MeOH

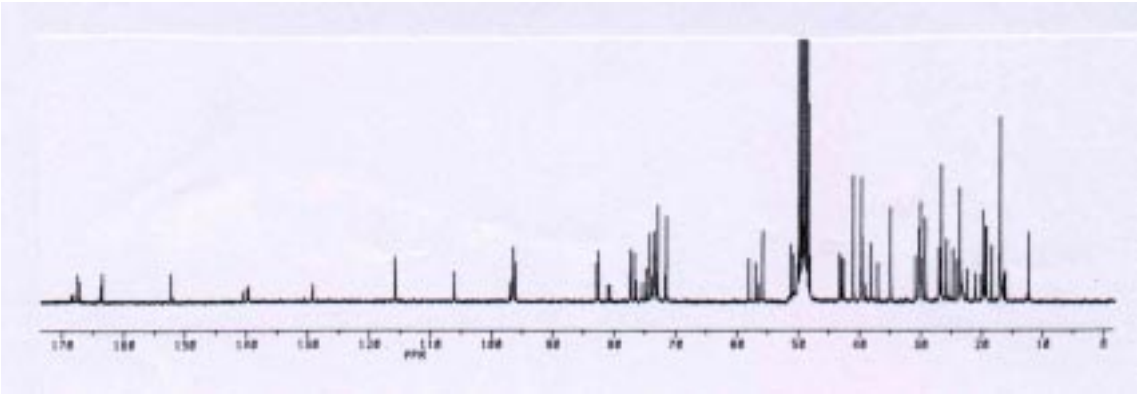


Abbildung 39: IR-Spektrum der Verbindung 3 auf NaCl

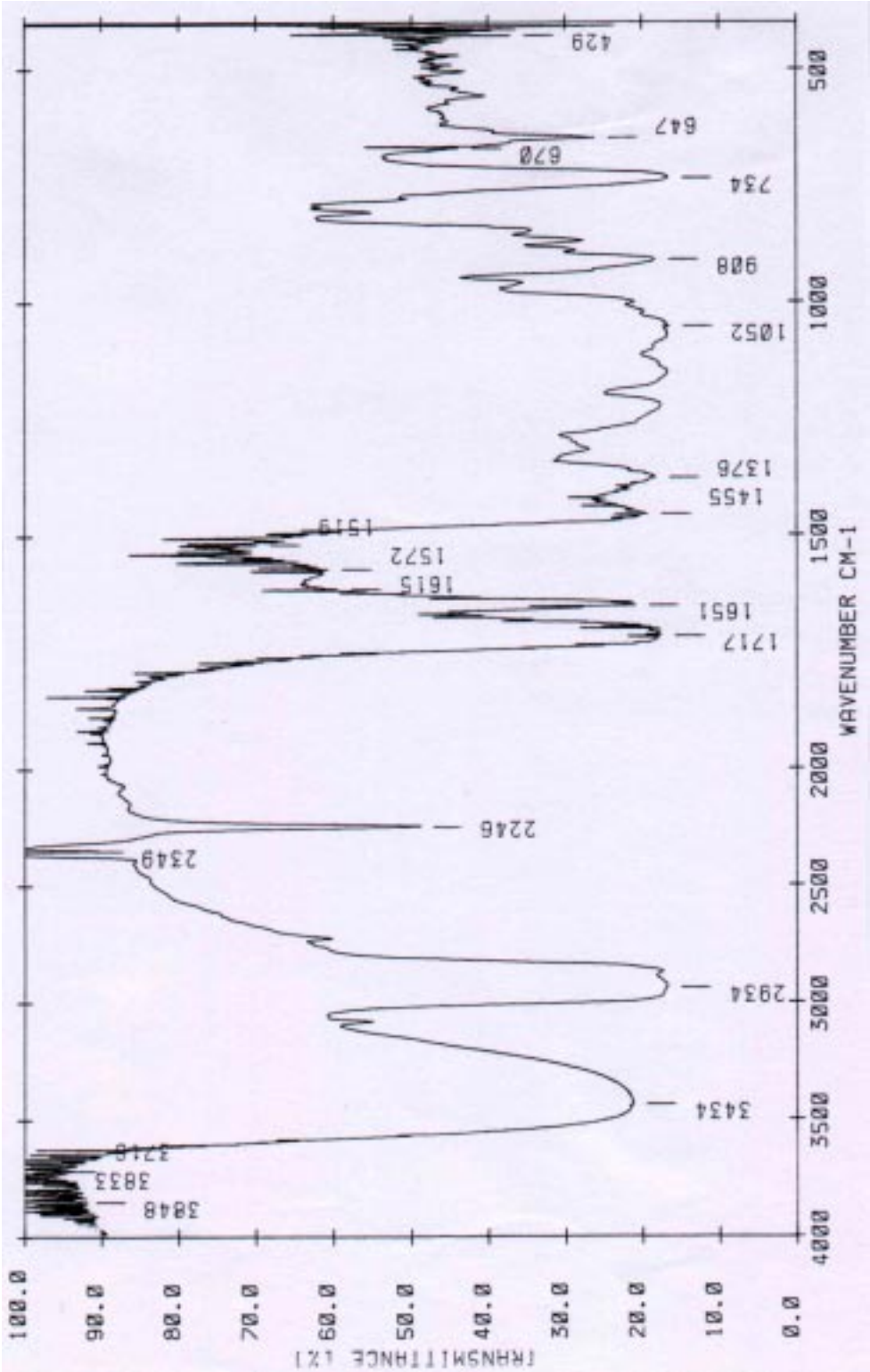


Abbildung 41: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung 3 in MeOH

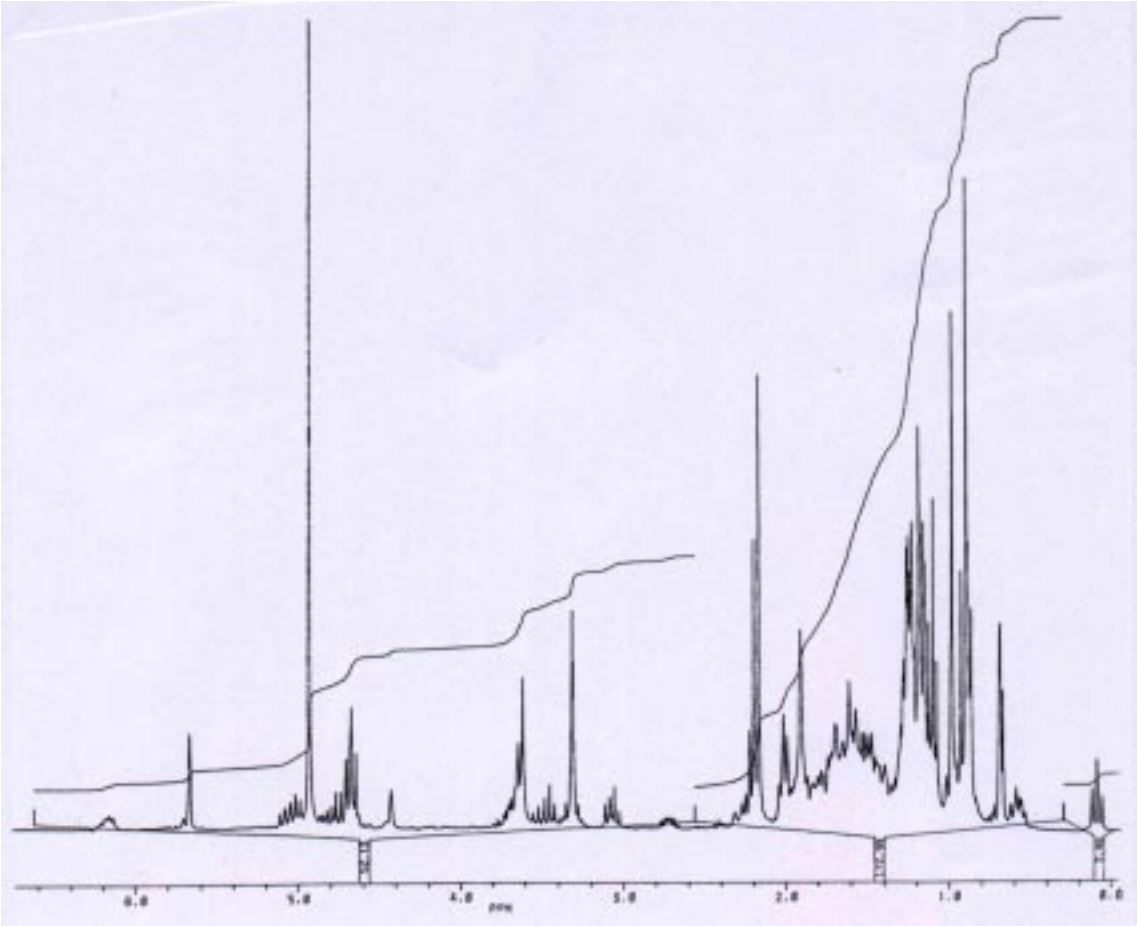


Abbildung 42: IR-Spektrum der Verbindung 4 auf NaCl

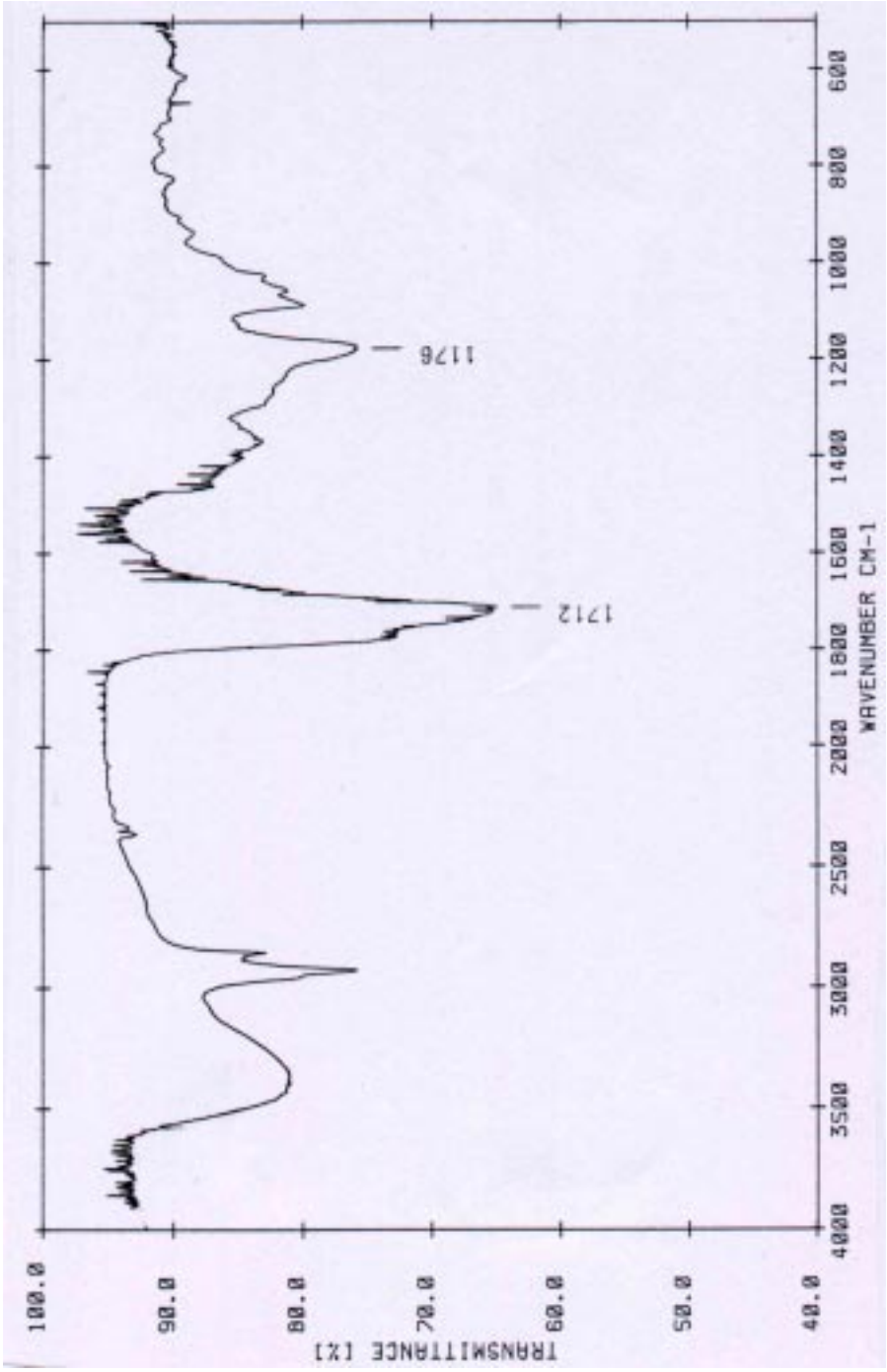


Abbildung 43: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung 4 in MeOH

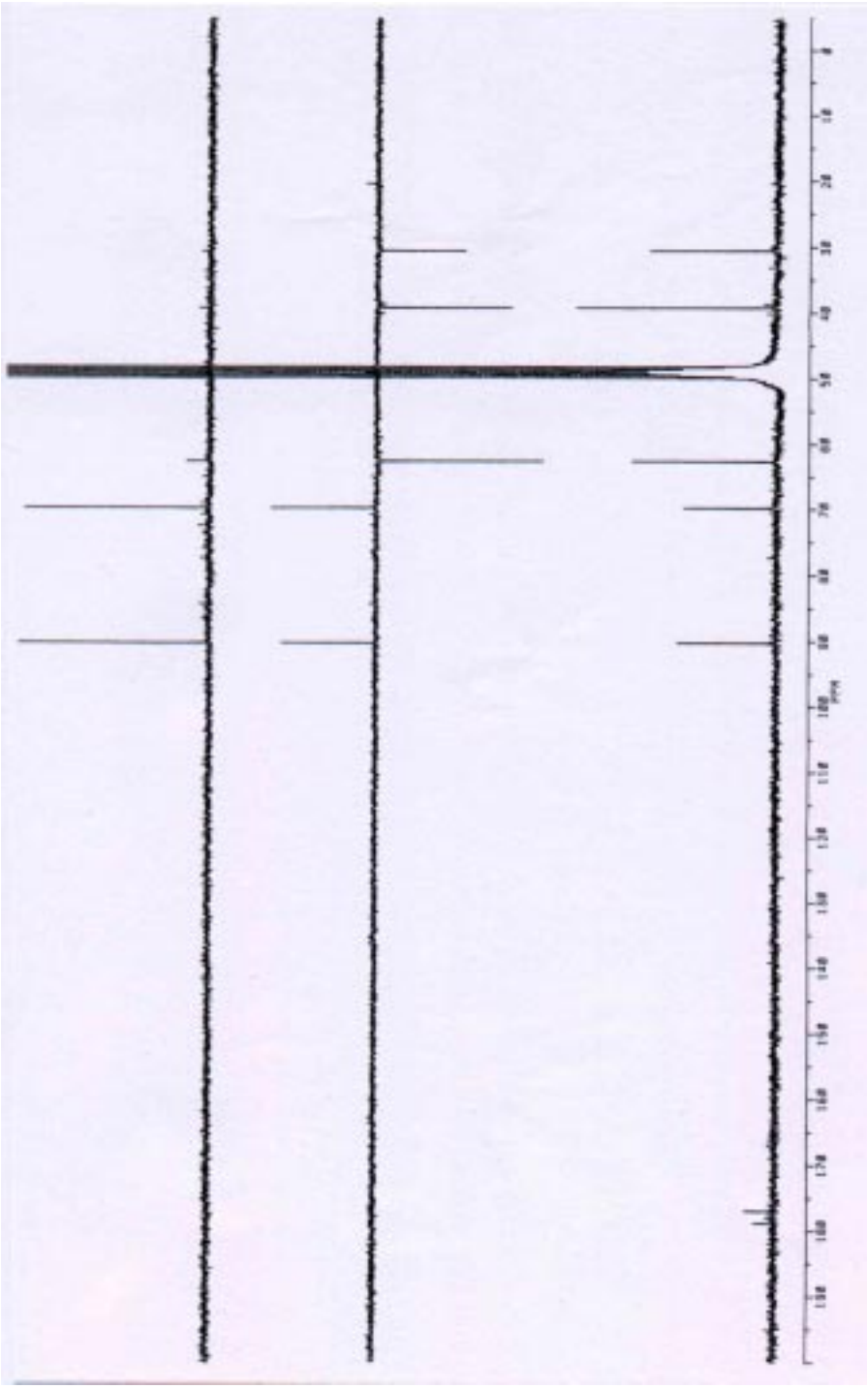


Abbildung 44: Massenspektrum der Verbindung 4

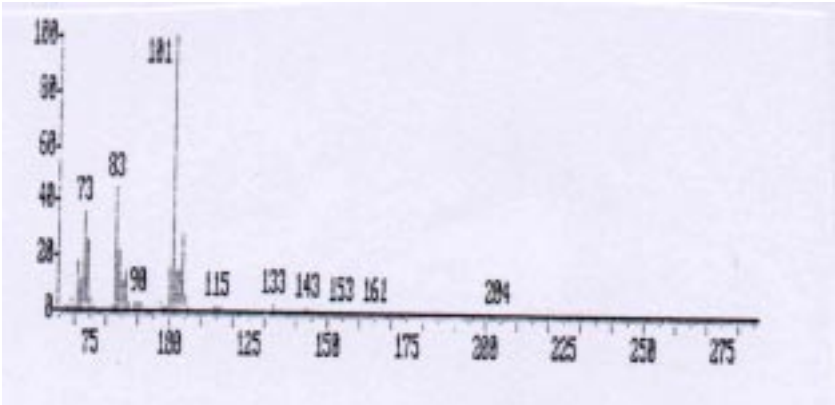


Abbildung 47: Massenspektrum von Chlorogensäure 8

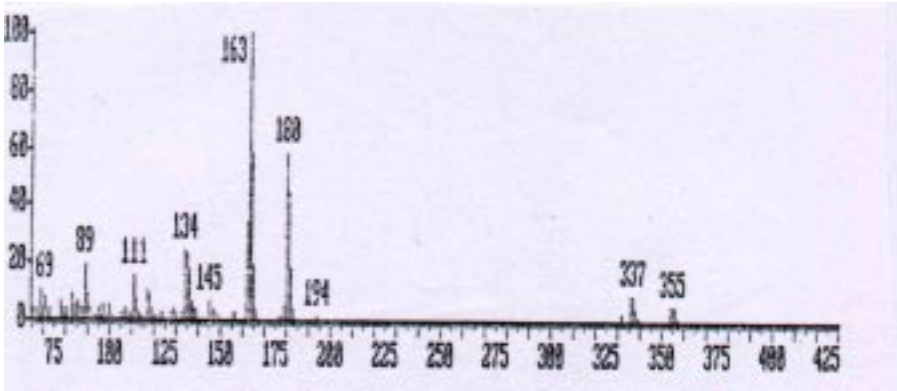


Abbildung 45: ^{1}H-NMR-Spektrum von Chlorogensäure 8 in MeOH

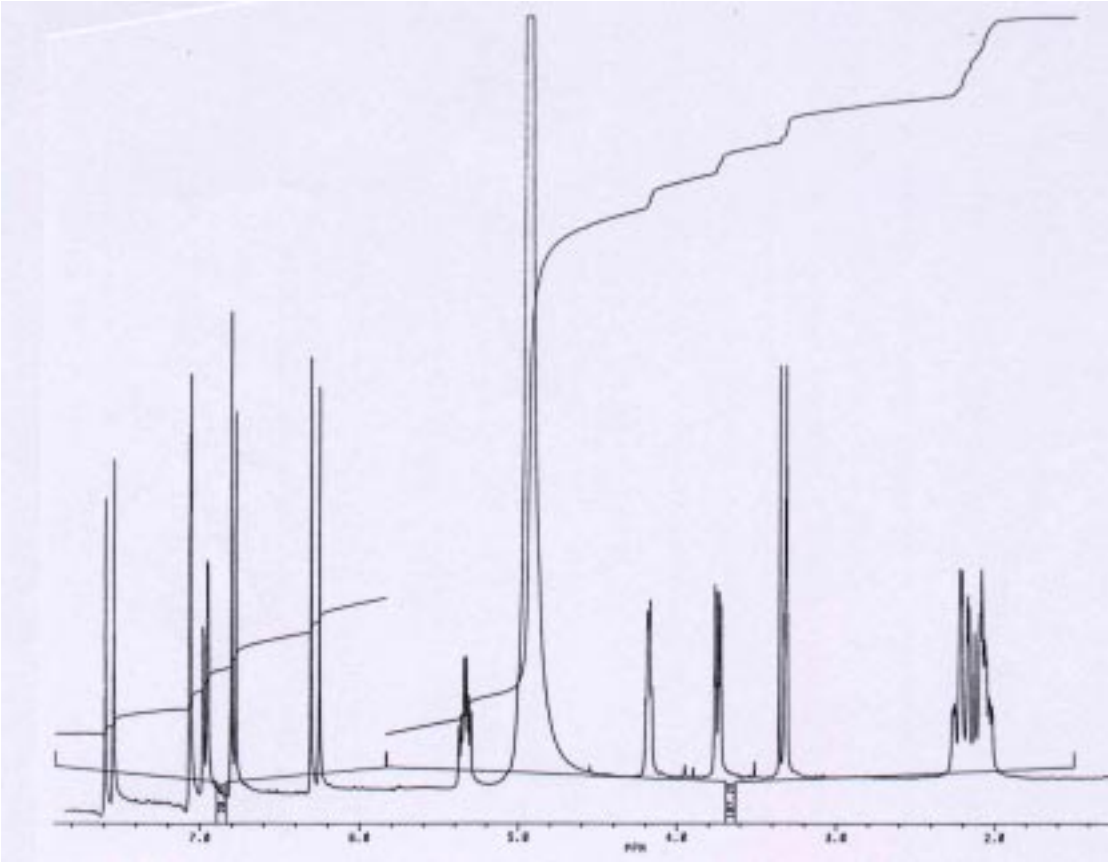


Abbildung 46: ^{13}C-NMR-Spektrum von Chlorogensäure 8 in MeOH

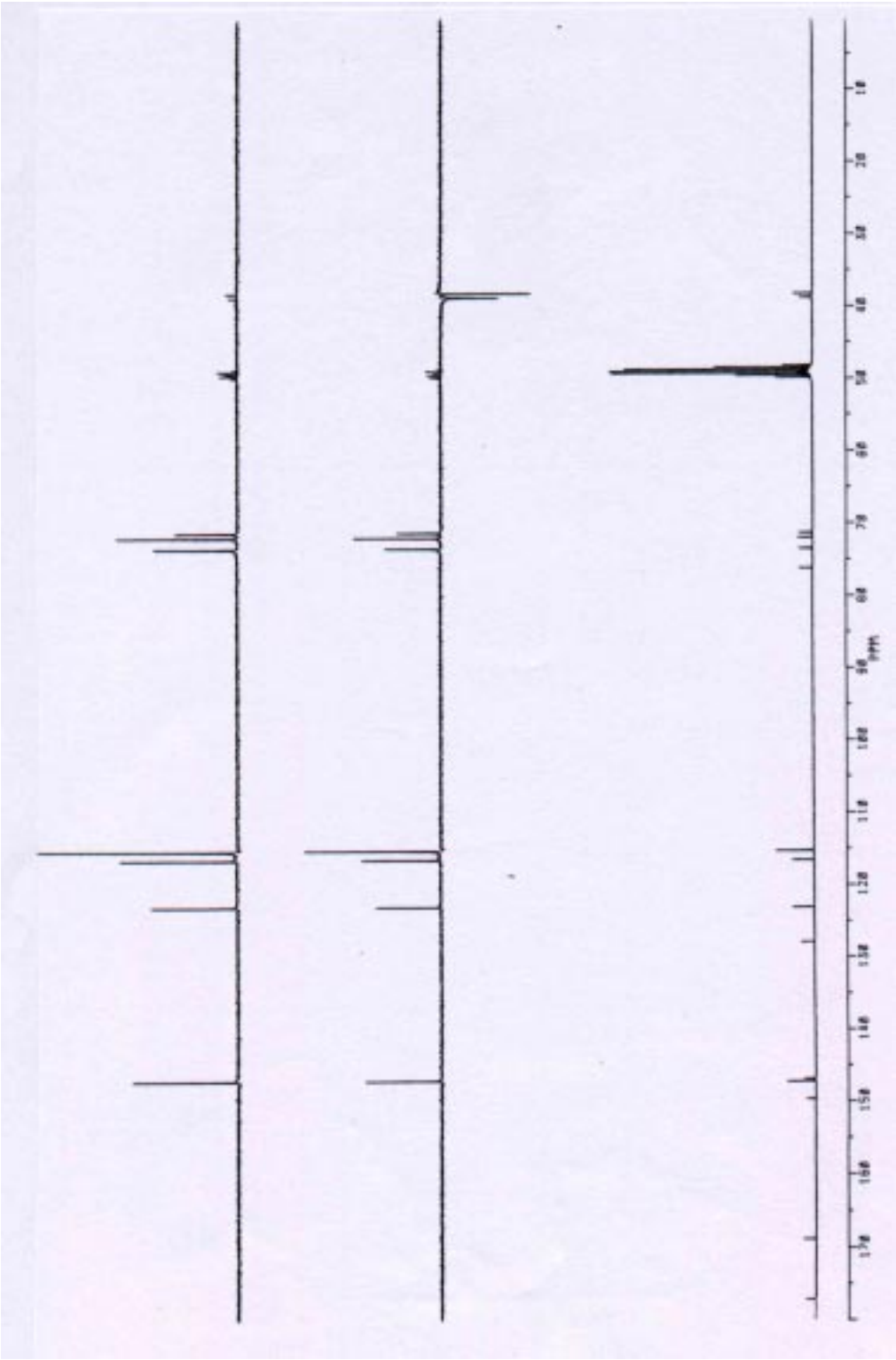


Abbildung 48: ^{1}H-NMR-Spektrum von 3-Acetoxy-urs-12-en 9 in $CDCl_3$/TMS

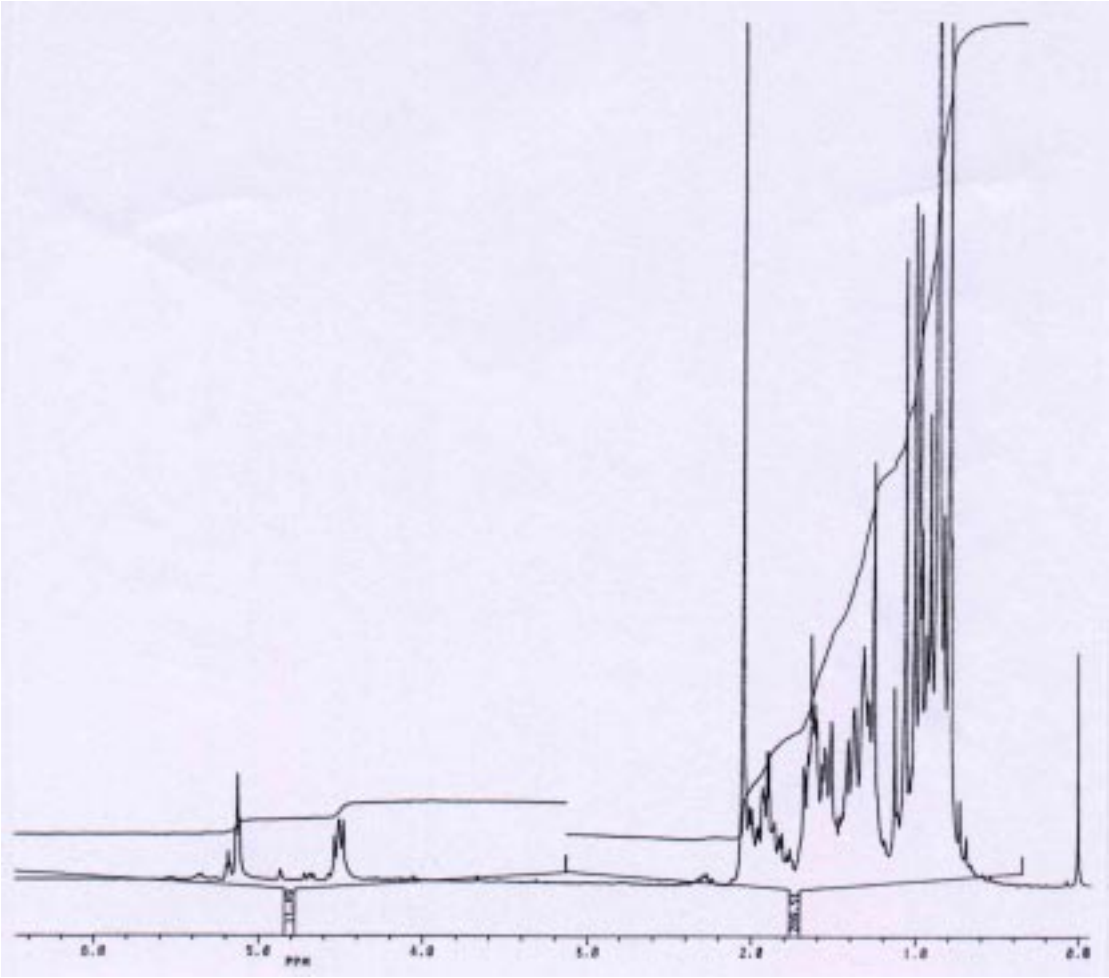


Abbildung 49: ^{13}C-NMR-Spektrum von 3-Acetoxy-urs-12-en 9 in $CDCl_3$

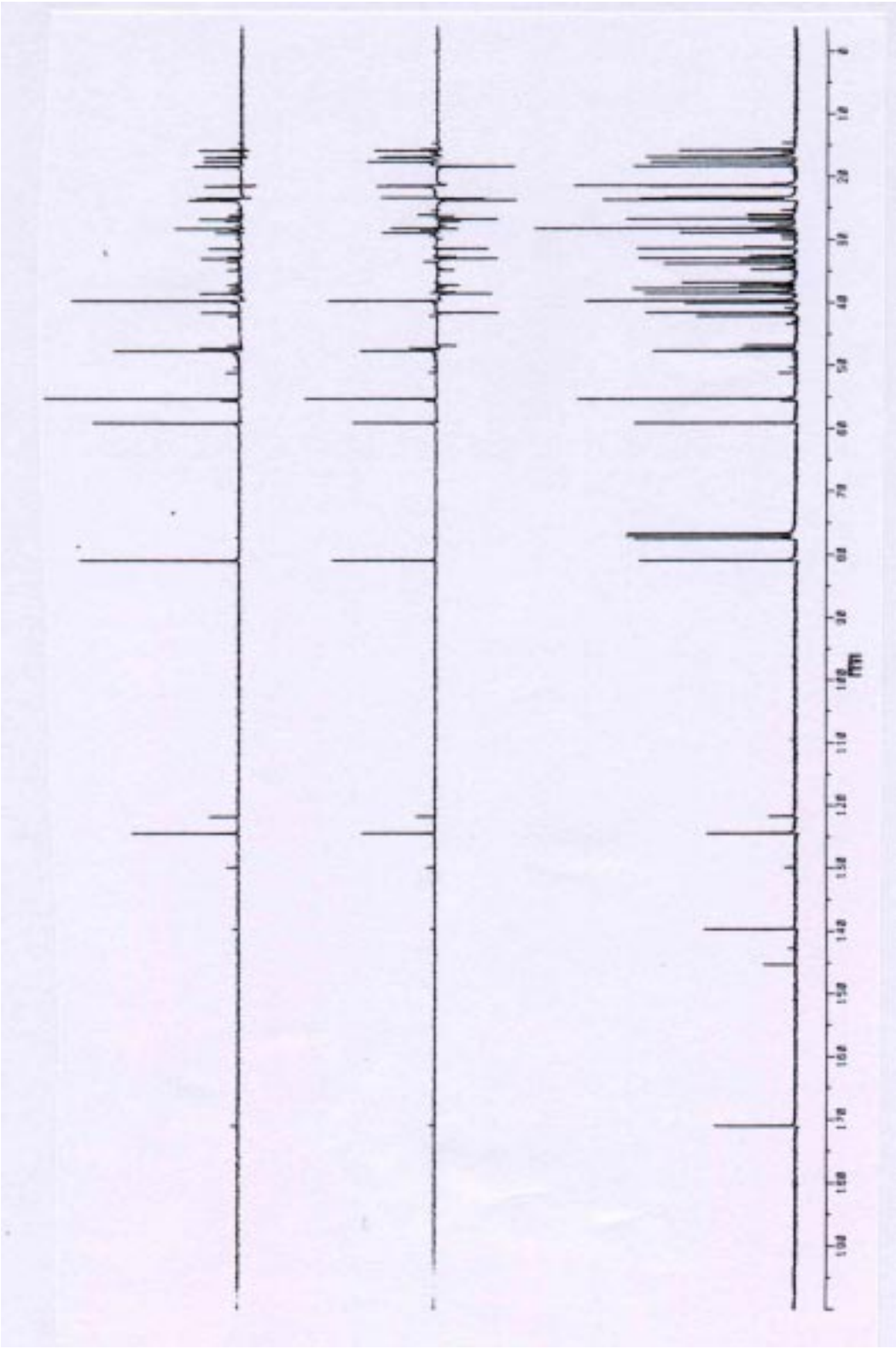


Abbildung 50: Massenspektrum von 3-Acetoxy-urs-12-en 9

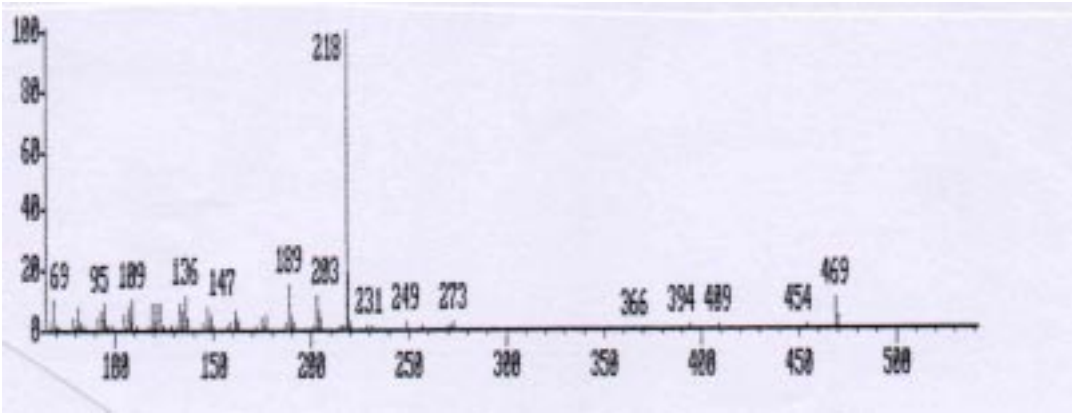


Abbildung 52: Massenspektrum von 3-Oxo-urs-12-en 10

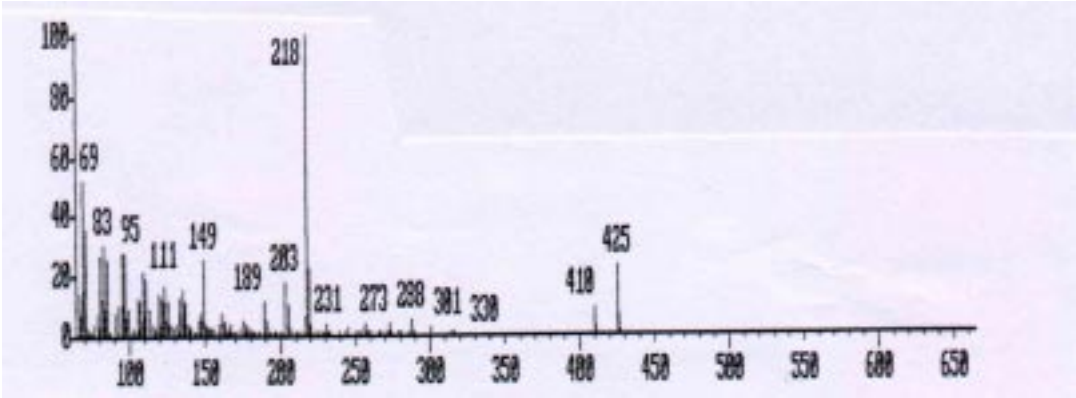


Abbildung 51: ^{1}H-NMR-Spektrum von 3-Oxo-urs-12-en <u>10</u> in $CDCl_3$

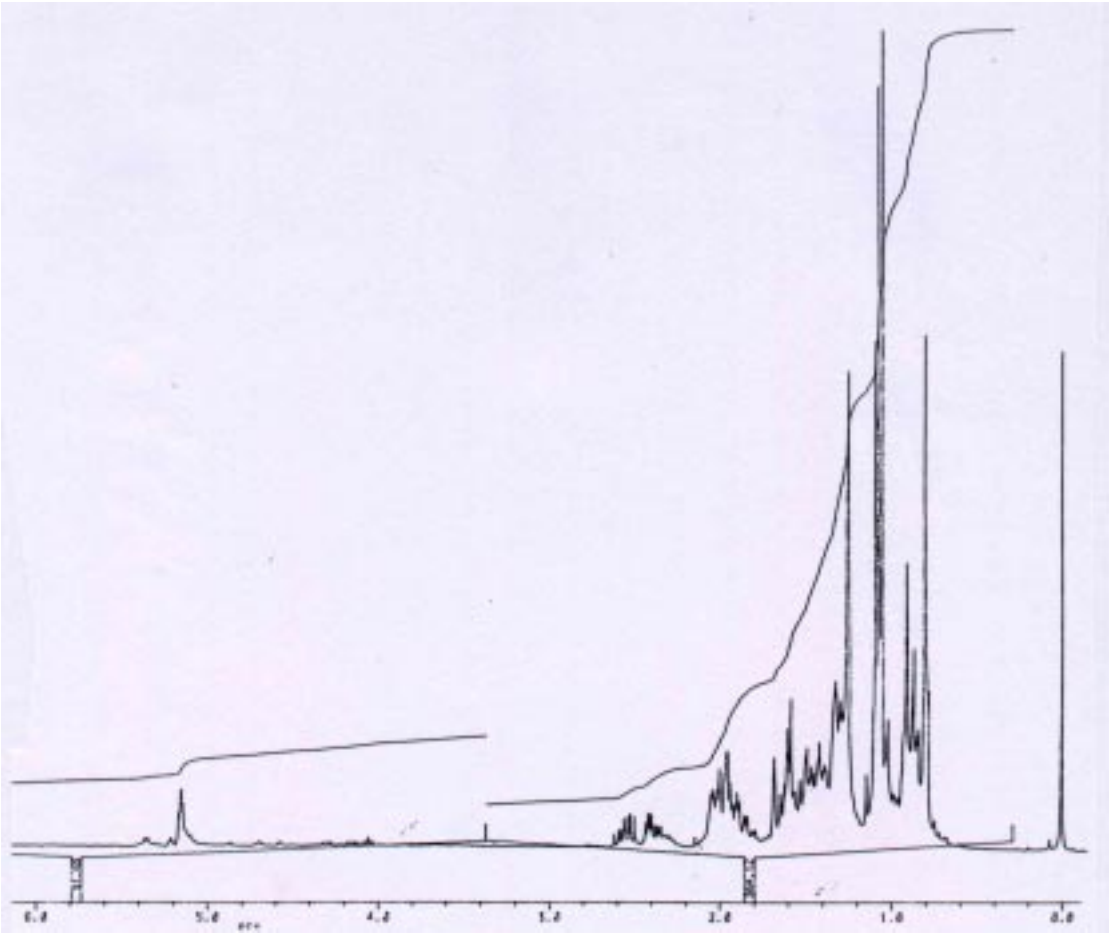


Abbildung 53: ^{1}H-NMR-Spektrum von α-Amyrin 11 in $CDCl_3$/TMS

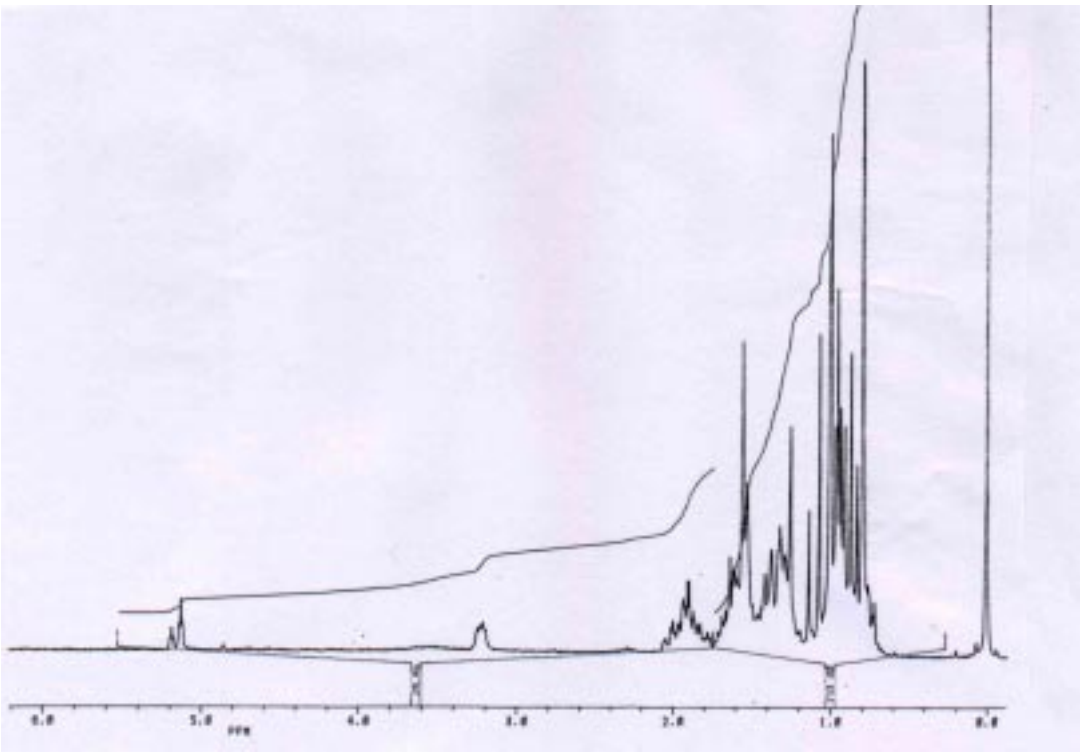


Abbildung 57: Massenspektrum von α-Amyrin 11

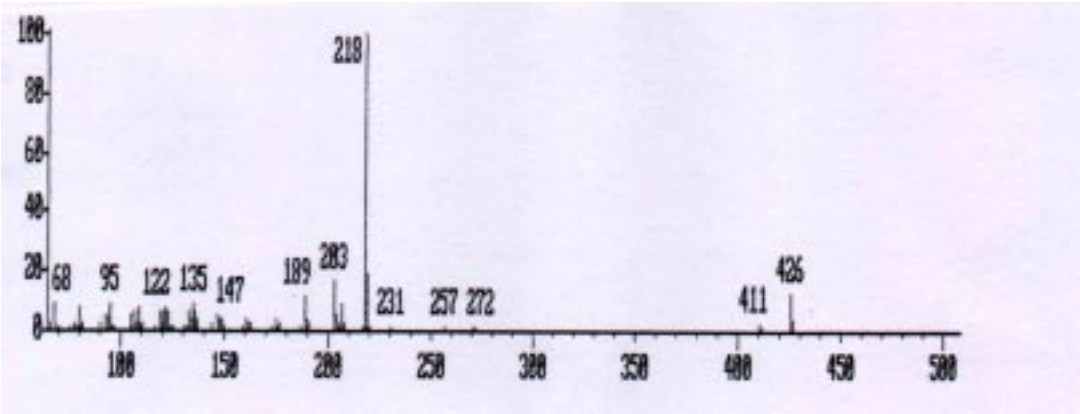


Abbildung 54: ^{13}C-NMR-Spektrum von α-Amyrin 11 in $CDCl_3$/TMS

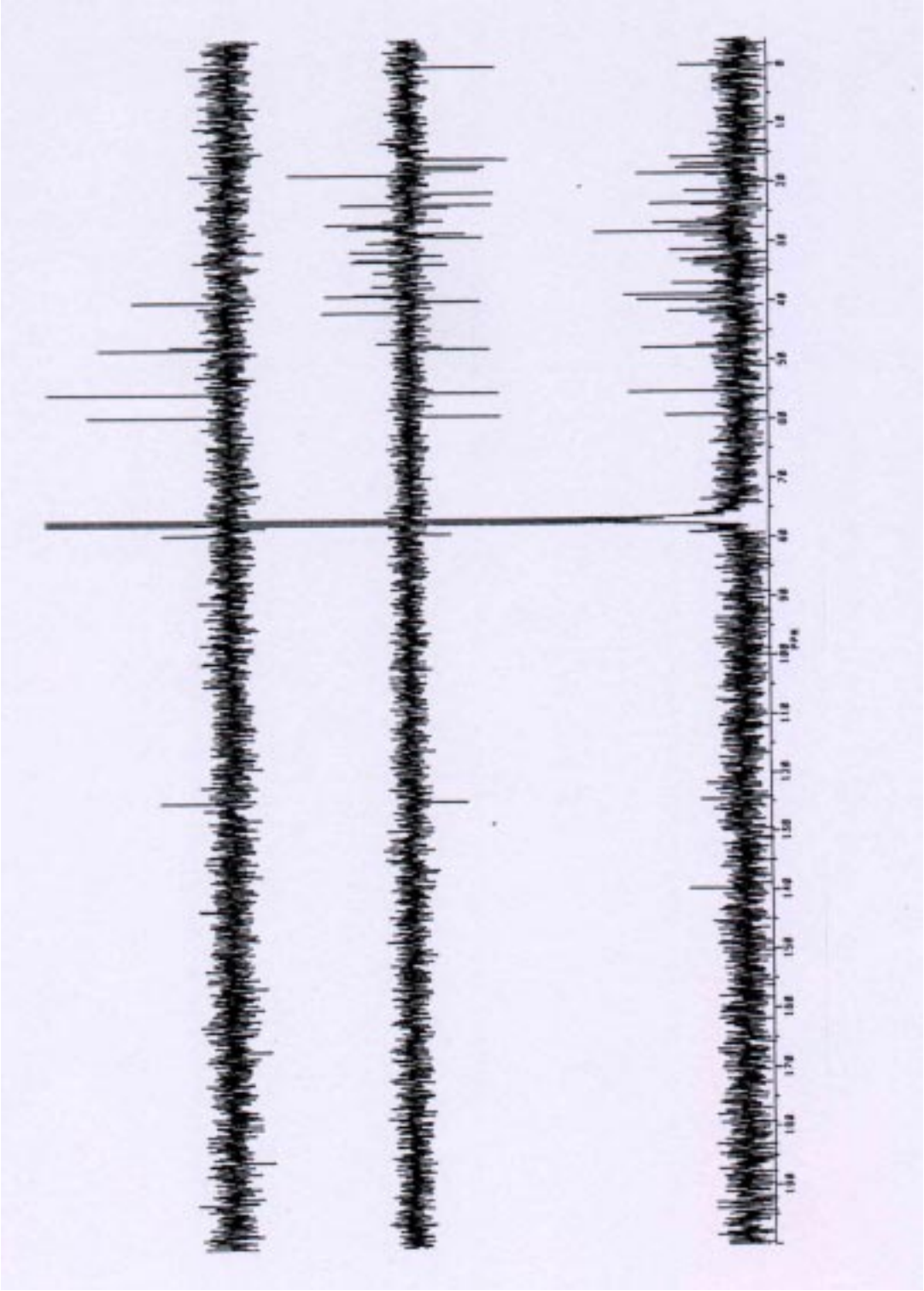


Abbildung 55: ^{1}H-NMR-Spektrum der Verbindung 12 in $CDCl_3$/TMS

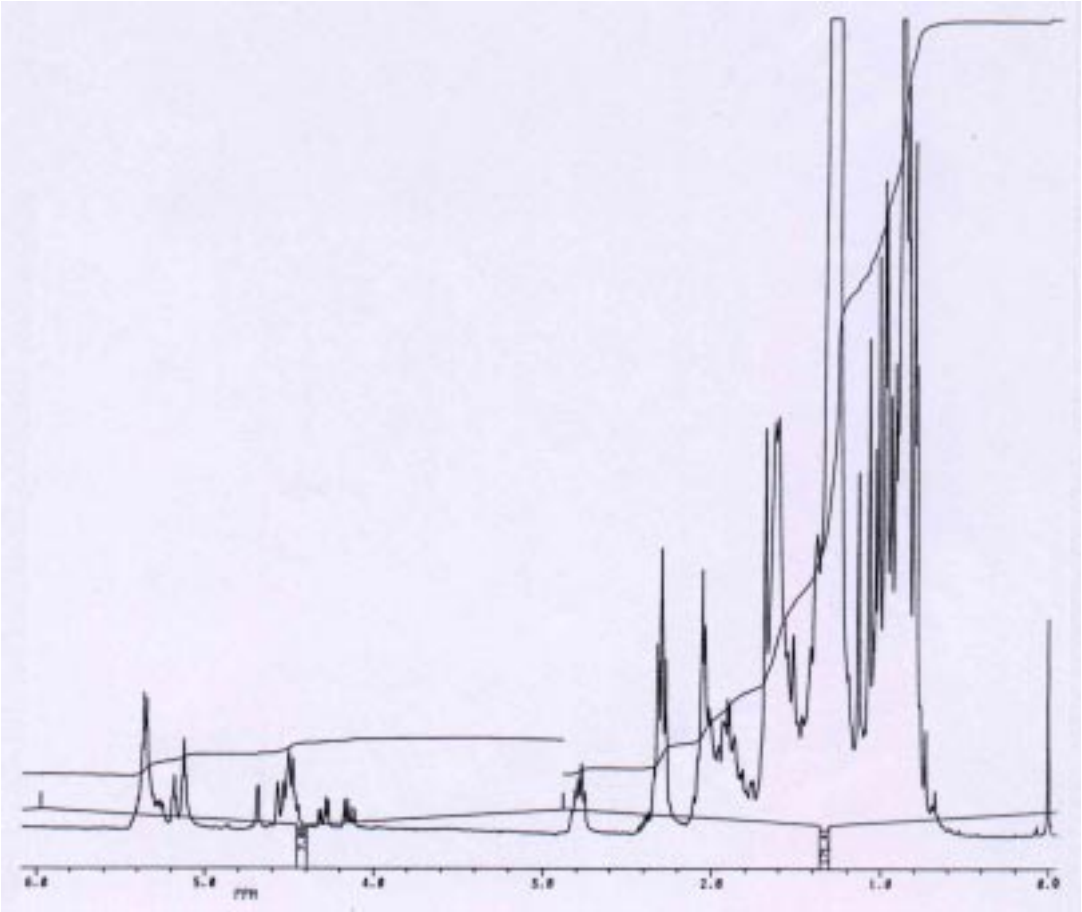
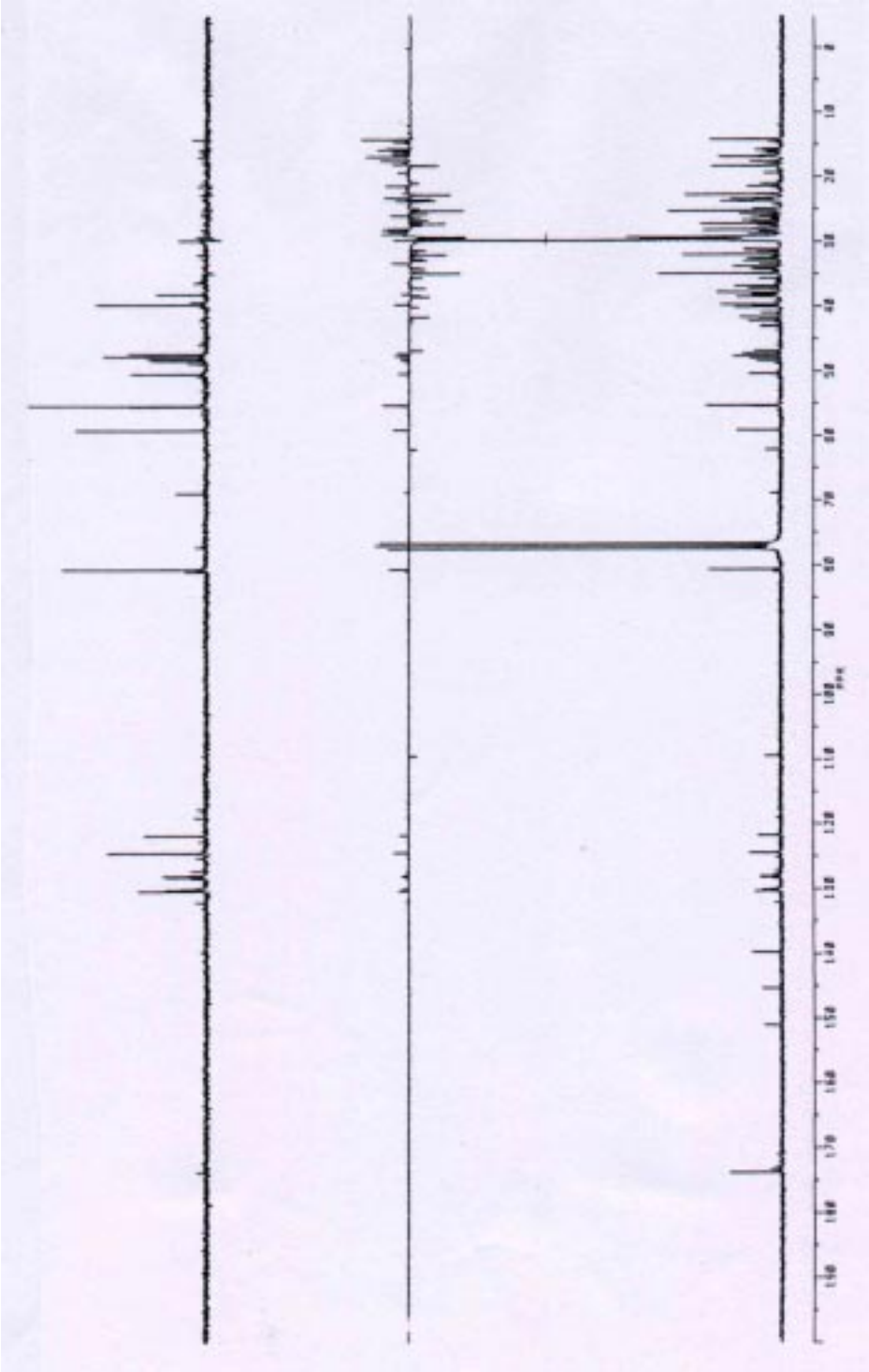


Abbildung 56: ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung 12 in $CDCl_3$



LITERATUR

[1] Habermehl, G. G.: *Gift-Tiere und ihre Waffen*, 5. Aufl., Springer Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest, 1994.

[2] Pough, R. N. H., R. D. G. Theakston: Incidence and mortality of snake bite in savanna Nigeria, *Lancet* II (1980), 1181-1183.

[3] Martz, W.: Plants with a reputation against snakebite, *Toxicon* **30** (1992), 1131-1142.

[4] Sutherland, S. K.: Antivenom use in Australia, *Med. J. Austr.* **157** (1992a), 734-739.

[5] Taube, D.: *Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover, 1994.

[6] Fuchs, L.: *New Kreütterbuch*, Basel, 1543.

[7] Richards, A. M.: *PhD-Arbeit*, Liverpool School of Tropical Medicine, 1994.

[8] Ferreira, L. A. F.: persönliche Mitteilung, 1997.

[9] Hediger, H.: Schlangen, in: B. Grzimek (Hrsg.): *Grzimeks Tierleben*, Enzyklopädie d. Tierreichs, Kindler Verlag, Band 6, 346-361, Zürich 1971.

[10] Mebs, D.: Schlangenbisse: Symptomatik und Therapie, *Die gelben Hefte* **XXIII** (1983), 45-48.

[11] Zlotkin, E.: Chemistry of animal venoms, *Experienta* **29** (1973),1453-1558.

[12] Bjarnason, J. B., J. W. Fox : Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms, *Pharmac.Ther.*, **62** (1994).

[13] Strydom, D. J. , F. J. Joubert, N. L. Howard: Chemical studies on protease A of *Bitis arietans* (Puff adder) venom, *Toxicon* **24** (1986), 247-257.

[14] Marsh, N.: Inventory of haemorrhagic factors from snake venoms, *Thromb. and Haemost.* **71/6** (1994), 793-797.

[15] Kini, R. M., H. J.Evans: Structural domains in venom proteins, *Toxicon* **34** (1992), 265-293.

[16] Vallee, B. L., D. S. Auld: Zinc coordination, function and structure of Zn enzymes and other proteins, *Biochemistry* **29** (1990), 5647-5659.

[17] Bjarnason, J. B., J. W. Fox: Hemorrhagic toxins from snake venoms, *J. Toxicol.-Toxins Rev.* **7** (1988/89), 121-209.

[18] Ownby, C. L.: Localy acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors, in: *Handbook of Toxinology*, 602-654, New York, Marcel Dekker, 1990.

[19] Obrig, T. C.: Direct zytotoxic effects of hemorrhagic toxins from *Crotalus ruber ruber* and *C. atrox* on human vascular endothel cells *in vitro*, *Micro-vasc. Res.* **46** (1993), 412-416.

[20] Kamiguti, A. S., C. R. M. Hay, R. D. G. Theakston, M. Zuzel: Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteases, *Toxicon* **34** (1996), 627-642.

[21] Mebs, D.: *Gifttiere*, Wiss. Verlagsges. mbH, Stuttgart, 1992.

[22] Gasperetti, J.: *J. Fauna of Saudi Arabia* **9** (1988), 340. Zit. nach: Morita, T., Yamada, D.: Ca^{2+}-dependent and Ca^{2+}-independent prothrombin activators in the venoms of Echis snakes, 13th European Symposium on animal, plant and microbial toxins, London, 1998.

[23] Warrel, D. A., N. McD. Davidson, B. M. Greenwood, L. D. Ormerod, H. Pope, B. J. Watkins, C. R. M. Prentice: Poisoning by bites of the Saw-scaled or Carpet viper (*Echis carinatus*) in Nigeria, *Q. J. Med.* **XLVI**, 181 (1977), 33-62.

[24] *WHO Offset Publication No.58*: Progress in the charakterisation of venoms and standardisation of antivenoms, 1981.

[25] Onuaguluchi, G.: Preliminary study of an extract from *Diodia scandens* on some toxic effects of *Echis carinatus* venom, *J. Ethnopharmacol.* **26** (1989), 189-196.

[26] Mors, W. B.: Plant active against snake bite, *Economic and medical plant research* **5** (1989), 353-373.

[27] Onuaguluchi, G., P. C. Okeke: Preliminary *in vitro* studies on the antagonistic effects of an ethanolic extract from *Diodia scandens* on *Echis carinatus* venom-induced changes in the clotting of human blood, *Phytotherapy Res.* **3** (1989), 11-14.

[28] Wang, W. P.: *Chung Yao Tung Pao* **11** (1986), 53-54. Zit. nach [26].

[29] Goncalves, L., B. M. Ruppelt, N. A. Perreira, M. G. Nascimento, B. Mors: 11th Symposium on Medicinal Plants of Brazil and 3rd Symposium on the Pharmacology and Chemistry of Natural Products, Jo⌖o Pessoa, Brazil, 1990.

[30] Tsai, L. H., L.-L. Yang, C. Chang: Inactivation of Formosan snake venoms *in vitro* by aristocholic acid, the chemical component of *Aristolochia* radix, *Formosan Science* **34** (1980), 40-44.

[31] Nagawaka, M., K. Nakanishi, L. L. Darko, J. A . Vick: Structures of cabenegrins A-I and A-II , potent anti-snake venoms, *Tetrahedron Lett.* **23** (1982), 3855-3858.

[32] Hunan Institute of Pharmaceutical Industries, Traditional experience of Chinese herb medicine, its application in drug research and new drug searching, in*: Natural Products as Medicinal Agents*, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1981.

[33] Tejasen, P., A. Chantaratham, D. Kanjanapothi: *Chiang Mai Med. Bull.* **8** (1969), 229. Zit. nach [26].

[34] Ferreira, L. A. F., O. B. Henriques, A. A. S. Andreoni, G. R. F. Vital, M. C. Campos, G. G. Habermehl, V. L. G. de Moraes: Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa*, *Toxicon* **30** (1992), 1211-1218.

[35] Okonogi, T., Z. Hattori: Detoxifying effect of Persimmon-tannin against snake venoms, *Snake* **9** (1978), 91-96.

[36] Mors, W. B., M. C. Nascimento, J. P. Parente, M. H. da Silva, A. Melo, G. Suarez-Kurtz: Neutralisation of lethal and myotoxic activities of south american rattlesnake venom by plant extracts and constituents of the plant *Eclipta prostratra* (Asteraceae), *Toxicon* **27** (1989), 1003-1009.

[37] Kini, R. M., T. Gowda: Studies on snake venom enzymes: Part 1: Purification of ATPase, a toxic omponent of *Naja naja* venom and it's inhibition by potassium gymnemate, *Ind. J. Biochem. Biophys.* **19** (1982), 152-154.

[38] Kini, R. M., T. Gowda: Studies on snake venom enzymes: Part 2: Partial charakterisation of ATPase from Russel's viper (*Vipera russelii*) and their interaction with potassium gymnemate, *Ind. J. Biochem. Biophys.* **19** (1982), 342-346.

[39] Calixto, J. B., M. Nicolau, R. A. Yunes: *Brit. J. Pharmacol.* **85** (1985), 729-731. Zit. nach [26].

[40] Liang, F. W.: *Chung Yao Tung Pao* **12** (1987), 54. Zit. nach [26].

[41] Houghton, P. J., K. Skari: The effect of Indian plants used against snake-bite on blood clotting, *J. Pharmacy Pharmacol.* **44** (1992), 1054.

[42] Houghton, P. J., A. L. Harvey: Investigation of the anti-snakevenom activity of *Schumannophyton magnificum*, *Planta Med.* **55** (1989), 273-275.

[43] Okogun, J. I., J. A. Adeboye, D. A. Okorie: Novel structures of two chromone alkaloids from rootbark of *Schumannophyton magnificum*, *Planta Med.* **49** (1983), 95-98.

[44] Akunvili, D. N., P. I. Akubue: *Proceedings of the 5th International Symposium on Medicinal Plants*, University of Ife, Nigeria, 1983.

[45] Houghton, P. J., I. M. Osibogun: Flowering plants used against snake-bite, *J. Ethnopharmacol.* **39** (1993), 1-29.

[46] Meusel, H., H. Ohle: Zur Taxonomie und Zytologie der Gattung Calendula, *Österreich. bot. Z.* **113** (1966), 191-210.

[47] Ohle, H.: Beiträge zur Taxonomie und Evolution der Gattung Calendula L. (II), *Feddes Repert.* **85** (1974), 245-283.

[48] Ohle, H.: Beiträge zur Taxonomie und Evolution der Gattung Calendula L. (III), *Feddes Repert.* **86** (1975), 1-17.

[49] Ohle, H.: Beiträge zur Taxonomie und Evolution der Gattung Calendula L. (IV), *Feddes Repert.* **86** (1975), 525-541.

[50] Strasburger, E., F. Noll, H. Schenck, A. F. W. Schimper: *Lehrbuch der Botanik*, 34. Aufl., neubearb. v. P. Sitte u. a., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart Jena Lübeck Ulm, 1998.

[51] Genaust, H.: *Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen,* 2. Aufl., Birkhäuser Verlag, Basel Boston Stuttgart, 1983.

[52] Madaus, G.: *Lehrbuch der botanischen Heilmittel*, Nachdruck von 1938, Georg Olms Verlag, Hildesheim New York, 1976.

[53] Isaac, O.: *Die Ringelblume: Botanik, Chemie, Pharmakologie*, *Toxikologie, Pharmazie und therapeutische Verwendung*, Wiss. Verl.-Ges. Stuttgart, 1992.

[54] Tutin, T. G., V. H. Heywood, N.A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb (Hrsg.): *Flora Europaea* **4**, Cambridge University Press, Cambridge London New York Melbourne, 1976.

[55] Ball, J.: Spicilegium Florae Maroccanae, *J. Linn. Soc.* **16** (1878), 516. Zit. nach [47].

[56] *Atlas Lekarstrw. SSSR*, Moskau 1962.

[57] Dörfler, F., G. Roselt: U*nsere Heilpflanzen*, Urania-Verlag, Leipzig Jena Berlin, 1976.

[58] Kasprzyk, Z., W. Janiszowska, E. Sobscyk: Metabolism of a new series of oleanolic acid glycosides in *Calendula officinalis* shoots, *Acta biochim. Polon.* **20** (1973), 231-235.

[59] Wojciechowski, Z., A. Jelonkiewicz-Konador, M. Tomaszewski, J. Jankowski, Z. Kasprzyk: The structure of glycosides of oleanolic acid isolated from the roots of *Calendula officinalis*, *Phytochemistry* **10** (1971), 1121-1124.

[60] Vecherko, L. P., E. P. Zinkevich, N. I. Libizov, A. I. Bankovskii: Calenduloside A from *Calendula officinalis*, *Khim. Prir. Soedin.* **5** (1969), 58-59.

[61] Vecherko, L. P., E. P. Zinkevich, N. I. Libizov, A. I. Bankovskii: The structure of Calendulosid A, *Khim. Prir. Soedin.* **7** (1971), 22.

[62] Vecherko, L. P., S. Kabanov, E. P. Zinkevich: The structure of Calenduloside B from *Calendula officinalis* roots, *Khim. Prir Soedin.* **7** (1971), 533.

[63] Vecherko, L. P., E. P. Zinkevich, M. L. Kogan: The structure of Calenduloside F from *Calendula officinalis* roots, *Khim. Prir. Soedin.* **9** (1973), 561-562.

[64] Vecherko, L. P., A. F. Sviridov, E. P. Zinkevich, M. L. Kogan: The structure of Calenduloside G and H from *Calendula officinalis* roots, *Khim. Prir. Soedin.* **10** (1974), 532-534.

[65] Vecherko, L. P., A. F. Sviridov, E. P. Zinkevich, M. L. Kogan: The structure of Calenduloside C and D from *Calendula officinalis* roots, *Khim. Prir. Soedin.* **11** (1975), 366-373.

[66] Vecherko , L. P.: Glucopyranoside of oleanolic acid from *Calendula officinalis* roots, *Khim. Prir. Soedin.* **9** (1974), 560-561.

[67] Wojciechowski, Z., M. Bochenska, B. Kucharczak, Z. Kasprzyk: Sterol and triterpene alcohol esters from *Calendula officinalis*, *Phytochemistry* **11** (1972), 1165-1168.

[68] Kasprzyk, Z., J. Pyrek: Triterpenic alcohols of *Calendula officinalis* L. flowers, *Phytochemistry* **7** (1968), 1631- 1639.

[69] Kasprzyk, Z., J. Pyrek, J. Sliwowski: Free and ester bound methyl-sterols and triterpenic monols in *Calendula officinalis* L., *Bull. Akad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.* **15** (1967), 723-726.

[70] Kasprzyk, Z., B. Wilkomirski: Structure of a new triterpene triol from *Calendula officinalis* flowers, *Phytochemistry* **12** (1973), 2299-2300.

[71[Adler, G., Z. Kasprzyk: Distribution of triterpene alcohols in subcellular fractions from *Calendula officinalis* flowers, *Phytochemistry* **15** (1976), 205-207.

[72] Kasprzyk, Z., J. Pyrek: Sterols of five plants of the Compositae family, *Roczniki Chem.* **41** (1967), 201-208.

[73] Kasprzyk, Z., J. Pyrek, G. Turowska: The variations of free and bound sterols in *Calendula officinalis* during vegetation, *Acta Biochim. Polon.* **15** (1968), 149-159.

[74] Wojciechowski, Z.: Biosynthesis of sterol glycosides in cell-free preparations from *Calendula officinalis* L., *Acta biochim. Polon.* **19** (1972), 43-49.

[75] Wojciechowski, Z., J. Zimowski: Acyl composition and biosynthesis of acylated steryl glycosides in *Calendula officinalis*, *Biochem. Biophys. Acta* **398** (1975), 111-117.

[76] Sliwowski, J. K., E. Caspi: Biosynthesis of phytosterols in *Calendula officinalis* flowers from (2R)- and (2RS)-[2-^{14}C, 2-^{3}H]-mevalonic acid, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1976, 96-197.

[77] Wilkomirski, B., Z. Kasprzyk: Free and ester-bound sterols in cellular subfractions of *Calendula officinalis* flowers, *Phytochemistry* **18** (1979), 253-255.

[78] Kasprzyk, Z., G. Turowska, E. Baranowska: Structure of sterol esters and triterpenic monol esters from the flowers of *Calendula officinalis* L., *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Chim.*, Vol. XVII, **7** (1969), 399-401.

[79] Pyrek, J.: A new 4ß-methyl-sterol from marygold flowers, *J. Chem Soc. Chem. Commun.* 1969, 107-108.

[80] ·liwowski, J., Z. Kasprzyk: Stereospecificy of sterol biosynthesis in *Calendula officinalis* flowers, *Phytochemistry* **13** (1974), 1451-1457.

[81] Pyrek, J., A. Schmidt-Szalowska: The reinvestigation on the properties of citrostadienol (α_1-sitosterol) and the revision of C-4 configuration of citrostadienol isolated from *Calendula officinalis* L., *Roczniki Chem.* **51** (1977), 951-958.

[82] Janssen, A.M.: *Dissertation*, Rijksuniversiteit te Leiden, 1989. Zit. nach [53].

[83] Marczal, G., Z. Cserjesi, Hothelyi, G. Petri: Data on the essential oil content and composition of *Calendula officinalis*, *Herba Hung*. **26** (1987), 179-189.

[84] Hänsel, R., K Keller, H. Rimpler, G. Schneider (Hrsg.): *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis* **4**, 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1992.

[85] Goodwin, T. W.: Studies in carotenogenesis. 13. The carotinoids of the flowers of *Calendula officinalis*, *Biochem.J.* **58** (1954), 90-94.

[86] Toth, G., J. Szabolcs: Occurence of some mono-cis-isomers of asymmetric C_{40}-carotinoides, *Phytochemistry* **20** (1981), 2411-2415.

[87] Masterova, I., Z. Grancaiova, S. Uhrinova, V. Suchy, K. Ubik, M. Nagy: Flavonoids in flowers of *Calendula officinalis* L., *Chem. Papers* **45** (1991), 105-108.

[88] Komissarenko, N. F., A. I. Derkach, V. T. Chernobai: Flavonoids of inflorescences of *Calendula officinalis*, *Khim. Prir. Soedin.* **6** (1988), 795-801.

[89] Hodisan, V., M. Tamas, I. Mester: Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in plant products of cosmetic interest, *Clujul. Med.* **58** (1985), 378-381.

[90] Friedrich, H.: Untersuchungen über die Isorhamnetinglykoside aus den Blüten von *Calendula officinalis*, *Archiv der Pharmazie* **295** (1962), 464-471.

[91] Peneva, P., S. Ivancheva, A. Vitkova, V. Kozovska: Flavonoids in *Calendula officinalis*, *Rasteniev Nauki* **22** (1985), 50-56.

[92] Derkach, A. I., N. F. Komissarenko, V. T. Chernobai: Coumarins of the inflorescences of *Calendula officinalis* and *Helichrysum arearium*, *Khim. Prir. Soedin*. **6** (1986), 777.

[93] Westhaus, R.-G.: *Dissertation,* H.-Heine Universität Düsseldorf, 1990.

[94] ·wiatek, L., J. Gora: Phenolic acids in the inflorescences of *Arnica montana* L. and *Calendula officinalis* L., *Herba Polon*. **24** (1978), 187-192.

[95] Kurowska, A., D. Kalemba, J. Gora, R. Zafernowski: Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids in Marygold (*Calendula officinalis*) inflorescences, *Acta Pol. Pharm*. **42** (1985), 473-477.

[96] Schwarz, P.: *Dissertation*, Universität Hannover, 1995.

[97] Varljen, J., A. Liptak, H. Wagner: Structural analysis of rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno-stimulating activity from *Calendula officinalis*, *Phytochemistry* **28** (1989), 2379-2383.

[98] Chushenko, V. N., G. A. Zhukov, O. E. Kamarova, G. V. Obolentseva, N. P. Dzyuba: Carbohydrates of the inflorescences of *Calendula officinalis*, *Khim. Prir. Soedin*. **4** (1988), 585-586.

[99] Komae, H., N. Hayashi: n-Paraffins of the petals of *Calendula officinalis*, *Phytochemistry* **10** (1971), 1944.

[100] Benigni, R., C. Capra, P. E. Cattorini: *Medicinal plants - chemistry, pharmacology and therapy*, Vol.II, Inverni and Della Beffa, Milano, 1964.

[101] Janiszowska, W., W. Michalski, Z. Kasprzyk: Polyprenyl quinones and α-Tocopherol in *Calendula officinalis*, *Phytochemistry* **15** (1976), 125-127.

[102] Chapinska, M. G., V. O. Golovkin: Antimicrobial action of some extracts from flowers of *Calendula officinalis*, *Farmatseut.Zh*. **18** (1963), 56-60.

[103] Gracza, L. : Oxygen containing terpene derivates from *Calendula officinalis* , *Planta Med*. **53** (1987), 227.

[104] Della Loggia, R., A. Tubaro, S. Sosa, J.Jurenitsch, H. Becker, S. Saar, O. Isaac: The role of triterpenoids in the topiccal anti-inflammatoric activity of *Calendula officinalis* flowers, *Planta Med*. **60** (1994), 516-520.

[105] Zitterl-Eglseer, K., S. Sosa, J. Jurenitsch, M. Schubert, R. Della -Loggia, A. Tubaro, M. Bertoldi, C. Franz: Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marygold (Calendula officinalis L.), *J. Ethnopharmacol*. **57** (1997), 139-144.

[106] Kloucek-Popova, E., A. Popov, N. Pavlova, S. Krusteva: Influence of the physiological regeneration and epithelization using fractions isolated from *Calendula officinalis*, *Pharmacol. Bulg*. **8** (1982), 63-67.

[107] Monographie der Kommission E Bundesgesundheitsamt, BAnz Nr. 5 vom 13.3.1986.

[108] Hänsel, R., R. Haas: *Therapie mit Phytopharmaka*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1983.

[109] Schneider, E., J. Hölzl, B. Eckes, C. Mauch, C. G. Schirren: Effects of carotenoids extracted from *Calendula officinalis* on proliferation and chemotaxis of human fibroblasts and on concentration of collagen lattices by fibroblasts, *Planta Med*. **57**, Suppl.Issue 2 (1991), A60.

[110] Schneider, E., *Dissertation*, Philipps - Universität Marburg, 1993.

[111] Luckner, M., O. Bessler, R. Luckner in: Jung, F., L. Kny, W. Poethke (Hrsg.): *Kommentar zum DAB 7*, Akademie Verlag Berlin, 1969.

[112] Fischer, G.: *Heilkräuter und Arzneipflanzen*, 3. Aufl., Karl F. Haug, Ulm/ Donau, 1966.

[113] El-Gengaihi, S., N. Abdallah, I. Sidrak: The effect of fertilization on flowering, oleanoic acid and phytosterol content of *Calendula officinalis* L., *Pharmazie* **37** (1982), 511-514.

[114] Elias, R., M. De M◷o, E. Vidall-Ollivier, M. Laget, G. Balansard, G. Dumenil: Antimutagenic activity of some saponins from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L. and *Hedera helix* L., *Mutagenesis* **5** (1990), 327-331.

[115] Kalvatchev, Z., R. Walder, D. Garzaro: Anti-HIV-activities of extracts from *Calendula officinalis* flowers, *Biomed.-Pharmacother.* **51** (1997), 176-180.

[116] Eichhorn, O.: *Obst und Gemüse*, Fachbuchverlag Leipzig, 1990.

[117] Franke, W.: *Nutzpflanzenkunde*, 5. Aufl., Thieme Verlag Stuttgart New York, 1992.

[118] Schlosser, S., P. Hanelt: *Wildpflanzen Mitteleuropas*, Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, 1991.

[119] Tolstikhina, V. V., O. V. Bryanski, A. I. Syrchina, A. A. Semenov: Chemical composition of a culture of tissue of *Scorzonera hispanica*, *Khim. Prir. Soedin.* **5** (1988), 763-764.

[120] Öksüz, S., N. Gören, A. Ulubelen: Terpenoids from *Scorzonera tomentosa, Fitoterapia* **LXI** (1990), 92-93.

[121] Karrer, W.: *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, 2. Aufl., Birkhäuser Verlag Basel Stuttgart, 1976.

[122] Menichini, F., G. Statti: Flavonoid glycosides from *Scorzonera columnae, Fitoterapia* **LXV** (1994), 555-556.

[123] Winter, M., W. Brandl, K. Herrmann: Bestimmung von Hydroxyzimtsäure-Derivaten in Gemüse, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **184** (1987), 11-16.

[124] Tarrach, F., K. Herrmann: Organische Säuren der Gemüsearten II, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **181** (1985), 313-315.

[125] Stöhr, H., K. Herrmann: Über die Phenolsäuren des Gemüses, *Zeitschr. Lebensm. Unters. Forsch.* **159** (1975), 219-224.

[126] Herrmann, K.: Über Oxydationsfermente und phenolische Substrate in Gemüse und Obst. I., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **106** (1957), 341-348.

[127] Erbe, S.: Beitrag zur Untersuchung und Wertbestimmung des Lebertrans unter Berücksichtigung des Vitamin A, *Dissertation*, Halle, 1956.

[128] Nasirulla, W. G., A. Seher: Fatty acid composition of lipids from edible parts and seeds of vegetables, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **86** (1984), 264-268.

[129] Trebes, K.: *FAZ Magazin* Nr. **881** (1997), 32.

[130] Lötschert, W., G. Beese: *BLV Bestimmungsbuch*: Pflanzen der Tropen, 4. Aufl., BLV Verlagsges. mbH, München, 1992.

[131] Schulungsunterlagen des Deutschen Teebüros, Hamburg, 1997.

[132] Franke, G. (Hrsg.): *Nutzpflanzen der Tropen und Subtropen*, Band 3: Spezieller Pflanzenbau, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 1994.

[133] Scholz, E., B. Bertram: *Z. Phytother.* **17** (1995), 235.

[134] Roberts, E. A., R. A. Cartwright, D. J. Wood: The flavonols of tea, *J. Sci. Food Agric.* **7** (1956), 637-646.

[135] Karrer, W.: *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, 2.Aufl., Birkhäuser Verlag, Basel Stuttgart, 1976.

[136] Wichtl, M. (Hrsg.): *Teedrogen und Phytopharmaka*, 3. Aufl., Wiss. Verlagsges. mbH, Stuttgart, 1997.

[137] Matsui, K., H. Toyota, T. Kajiwara, T. Kakuno, A. Hatanaka: Fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme, hydroperoxide lyase, from tea leaves, *Phytochemistry* **30** (1991), 2109-2113.

[138] Walter, C.: Faszination Tee, *ptA heute* **7** (1997), 643-648.

[139] Kuhr, S., U. H. Engelhardt: Determination of flavanols, theogallin, gallic acid and caffeine in tea using HPLC, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **192** (1991), 526-529.

[140] Rimpler, H.: *Biogene Arzneistoffe*, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1990.

[141] Jankun, J., S. H. Selman, R. Swiercz, E. Skrzypczak-Jankun: Why drinking green tea could prevent cancer, *Nature* **387** (1997), 561.

[142] Harwood, L. M.: Dry column flash chromatography, *Aldrichim. Acta* **18** (1985), 25-26.

[143] *The Sadtler Standard Spektra*, NMR, Sadtler Research Laboratories, Philadelphia, 1988.

[144] W. Bremser (Hrsg.): *Carbon-13-NMR spektral data*, 4. Aufl., VCH Verlagsges. mbH, Weinheim New York, 1987.

[145] Günther, H.: NMR-Spektroskopie, 2. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1983.

[146] Seo, S., Y. Tomita, K. Tori, Y. Yoshimura: Determination of the absolute configuration of a secondary hydroxy group using glycosidation shifts in carbon-13 NMR spektroskopy, *J. Amer. Chem. Soc.* **100** (1978), 3331.

[147] Ghosal, S., K. S. Saini: Sitoindoside I and II, two new antiulcerogenic sterylglycosides from *Musa paradisiaca*, *J. Chem. Res.* (S) 1984, 110.

[148] Chaurasia, N.: *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, 1987.

[149] Kelley, C.J., R. C. Harruff, M. Carmack: The polyphenolic acids of *Lithosperrmum ruderale*. II: Carbon-13 NMR, *J. Org. Chem.* **41**(1976), 449.

[150] Seo, S., Y. Tomita, K. Tori: Biosynthesis of oleanen- and ursen-type triterpenes from [4-^{13}C] mevalonolactone and [1,2-$^{13}C_2$] acetate in tissue cultures of *Isodon japonicus* Hara, *J. Amer. Chem. Soc.* **103** [1981), 2075-2080.

[151] Knight, S. A.: Carbon-13 NMR spektra of some tetra- and pentacyclic triterpenoids, *Org. Magn. Res.* **6** [1974), 603-611.

[152] Sells, P. G., A. M. Richards, G. D., Laing, R. D. G. Theakston: The use of hen's eggs as an alternative to the conventional *in vivo* rodent assay for antidots to haemorrhagic venoms, *Toxicon* **35** (1997), 1413-1421.

[153] Finney, D. J.: *Probit analysis*, Cambridge University Press, 1971.

[154] Sells, P. G., P. Ioannou, R. D. G. Theakston: A human alternative to the measurement of the lethal effects (LD_{50}) of non-neurotoxic venoms using hen's eggs, *Toxicon* **36** (1998), 985-991.

[155] Gerlach, L.: Über neue Methoden auf dem Gebiet der experimentellen Embryologie, *Anat. Anz.* **2** (1887), 583-609.

[156] Fere, L.: Teratogenie experimentale et pathologie generale, *Cinquantenaire de la societe de biologie, Vol. jub.* (1899), 360-369.

[157] Rosenbruch, M.: Toxizitätsuntersuchungen am bebrüteten Hühnerei, *Dermatosen* **38** (1990), 5-11.

[158] Imrecke, C.: *Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover, 1999.

[159] Stahl, E.: *Dünnschichtchromatographie*, 2. Aufl., Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1967.

[160] Jork, H., W. Funk, W. Fischer, H. Wimmer: *Dünnschichtchromatographie*, Band 1a, VCH Verlagsges. mbH, Weinheim 1989.

[161] Williams, D., I. Fleming: *Strukturaufklärung in der organischen Chemie*, 6. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1991.

Liste der Veröffentlichungen

K. Jantzen, G. Glünder, G. G. Habermehl: „Eine Modifizierung der *in ovo*-Methode zur Ermittlung der anti-hämorrhagischen Aktivität von Pflanzenextrakten“, *Toxicon* Vol. 37 (1999) (submitted)

K. Jantzen, C. Imrecke, D. Taube, G. G. Habermehl, A. M. Richards, R. D. G. Theakston: „Plant compounds active against snake bite“, *Toxicon* Vol. 37 (1999) (submitted)

Lebenslauf

Zur Person:	Kristina Jantzen Dopmeyerstr.8 31832 Springe geb. am 12.09.1963 in Gräfenthal verheiratet, ein Kind Staatsangehörigkeit: deutsch
Schulausbildung:	
1970-1978	Oberschule in Gräfenthal
1978-1982	Gymnasium in Neuhaus
1982	Abitur
Studium:	
1982-1987	Chemiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Fachrichtung Organische Chemie
Beruflicher Werdegang:	
09.1987-12.1987	Labor für Werkstoffprüfung im Maschinenbau Halberstadt
01.1988-03.1990	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Forschungsinstitut für Obst-und Gemüseverarbeitung Magdeburg
03.1990	Umzug nach Osnabrück
07.1990	Geburt meines Sohnes, danach Erziehungsurlaub
02.1992-10.1993	Zusatzstudium Ökologieassistentin an der Akademie für Fernstudium und Weiterbildung Bad Harzburg
02.1994	Umzug nach Hannover
05.1994-03.1995	Arbeit als Chemikerin im F/E-Labor, Sichel-Werke Hannover
seit 06.1995	Promotionsstudium an der Universität Hannover
seit 10.1995	Wissenschaftliche Hilfskraft bei der Betreuung von Studenten im Chemiepraktikum an der Tierärztlichen Hochschule Hannover