

**Umfassende Inhaltsstoffprofilierung von
Actaea-Drogen/Zubereitungen,
präparative Herstellung von Fraktionen sowie Isolierung,
Nachweis und Bioverfügbarkeit von lead substances in
Zusammenhang mit *in vivo* und *in vitro* Studien mittels
hoch auflösender state-of-the-art Methoden**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Markus Schuh

Nürnberg, 2013

| | |
|-----------------------------|-----------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. W. Blaschek |
| 2. Gutachterin: | PD Dr. Gudrun Abel |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 17.01.2014 |
| Zum Druck genehmigt: | 17.01.2014 |

gez. Prof. Dr. rer. nat. Duschl, Wolfgang
(Dekan)

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass die Dinge sind, wie sie sind.

Aristoteles

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| A. Einleitung und Zielsetzung | 1 |
| 1. <i>Actaea racemosa</i> L. [syn. <i>Cimicifuga racemosa</i> (L.) NUTT.] | 1 |
| 1.1. Geschichte <i>Actaea racemosa</i> | 1 |
| 1.2. Systematik und Taxonomie | 2 |
| 1.3. Botanik und Pflanzenmorphologie | 3 |
| 1.4. Morphologie Rhizoma..... | 4 |
| 1.5. Ernte | 5 |
| 1.6. Inhaltsstoffe..... | 6 |
| 1.6.1. Kohlenhydrate | 9 |
| 1.6.2. Phenolische Verbindungen..... | 10 |
| 1.6.3. Triterpenglycoside..... | 10 |
| 1.6.4. Alkaloide | 11 |
| 2. Symptomatik der Menopause | 11 |
| 3. Zielsetzung der Arbeit | 15 |
| B. Experimenteller Teil..... | 17 |
| 1. Drogenmaterial..... | 17 |
| 1.1. Herkunft und Ernte..... | 17 |
| 1.2. Drogenmaterial für Extraktionsverfahren..... | 20 |
| 1.3. Bionorica Spezialextrakt BNO 1055 | 21 |
| 2. Chemikalien | 22 |
| 2.1. Fraktionierungsprozess..... | 22 |
| 2.2. Chromatographie | 22 |
| 2.3. Reinsubstanzen | 22 |
| 3. Allgemeine Laborgeräte | 24 |
| 4. Chromatographische Methoden | 25 |
| 4.1. TLC..... | 25 |
| 4.2. HPLC-UV | 26 |
| 4.3. HPLC-ELSD | 27 |
| 4.4. Agilent HPLC-MS | 27 |
| 4.5. ABSciex API 5000 LC/MS/MS System..... | 28 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|--------|---|----|
| 4.6. | ABSciex tripleTOF 5600 System | 29 |
| 5. | Fraktionierungsprozess | 31 |
| 5.1. | Liquid-liquid Extraktion..... | 31 |
| 5.2. | Präparative Chromatographie | 31 |
| 6. | Pharmakologischer Teil..... | 33 |
| 6.1. | Osteoprotektive Aktivität | 33 |
| 6.1.1. | <i>In vivo</i> Rattenmodell | 33 |
| 6.1.2. | Ermittelte Parameter..... | 34 |
| 6.2. | Permeabilitätsstudie am Caco-2 Modell..... | 36 |
| 6.2.1. | Material | 37 |
| 6.2.2. | Herstellung der <i>Actaea racemosa</i> BNO 1055 - Stammlösung | 38 |
| 6.2.3. | Herstellung des modifizierten FaSSIF für die Caco-2 Transportversuche | 38 |
| 6.2.4. | Durchführung von Löslichkeitsversuchen..... | 39 |
| 6.2.5. | Kultivierung des Caco-2 Zellmodells..... | 39 |
| 6.2.6. | Durchführung der Caco-2 Transporte | 42 |
| 6.2.7. | Aufarbeitung der Permeabilitätsproben zur HPLC Analyse | 43 |
| 6.2.8. | Auswertung der Transportversuche..... | 44 |
| 6.3. | 5-HT 7 Rezeptorbindungsstudie | 46 |
| 6.3.1. | Testsystem..... | 46 |
| 6.3.2. | Herstellung der Prüflösungen..... | 47 |
| C. | Ergebnisse..... | 49 |
| 1. | Extraktionsverfahren <i>Actaea racemosa rhizoma</i> | 49 |
| 1.1. | Extraktionsmittel Ethanol 58 % (v/v)..... | 49 |
| 1.1.1. | Identitätsprüfung der Saponine mittels TLC | 49 |
| 1.1.2. | Gehaltsbestimmung von Isoferulasäure | 50 |
| 1.1.3. | Gehaltsbestimmung der Triterpenglycoside | 51 |
| 1.2. | Extraktionsmittel 2-Propanol 40 % (v/v) | 51 |
| 1.2.1. | Identitätsprüfung der Saponine mittels TLC | 51 |
| 1.2.2. | Gehaltsbestimmung von Isoferulasäure | 53 |
| 1.2.3. | Gehaltsbestimmung der Triterpenglycoside | 53 |
| 2. | Fraktionierung von BNO 1055..... | 55 |
| 2.1. | Gewinnung der Fraktionen | 55 |
| 2.2. | Charakterisierung der Subfraktionen..... | 60 |
| 2.3. | Reproduzierbarkeit des Fraktionierungsprozesses..... | 68 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|------------|
| 3. Pharmakologischer Teil..... | 73 |
| 3.1. Osteoprotektive Aktivität | 73 |
| 3.1.1. Futteraufnahme und Körpergewicht | 73 |
| 3.1.2. Einfluss auf Knochengewebe | 73 |
| 3.2. Caco-2 Permeabilitätsassay | 76 |
| 3.2.1. Löslichkeitsversuche | 76 |
| 3.2.2. Methodvalidierung Quantifizierung von 27-Deoxyactein | 79 |
| 3.2.2.1. Identität | 79 |
| 3.2.2.2. Kalibriergerade | 81 |
| 3.2.2.3. Verschleppung/ Carry-Over | 87 |
| 3.2.2.4. Genauigkeit..... | 88 |
| 3.2.2.5. Selektivität | 94 |
| 3.2.2.6. Wiederfindung | 97 |
| 3.2.2.7. Matrix Effekte | 98 |
| 3.2.3. Zytotoxizität | 99 |
| 3.2.4. Integrität der Zellpassage | 101 |
| 3.2.5. Anpassung des Caco-2 Modells | 102 |
| 3.2.6. Permeabilität 27-Deoxyactein | 104 |
| 3.3. Serotoninbindung | 108 |
| 3.3.1. Bindung an 5-HT 7..... | 108 |
| 3.3.2. Gehaltsbestimmung N ω -Methylserotonin..... | 112 |
| D. Diskussion | 117 |
| 1. Inhaltsstoffprofil Actaea racemosa..... | 119 |
| 2. Fraktionierung und Wirksamkeit einzelner Fraktionen..... | 122 |
| 3. Bioverfügbarkeit von 27-Deoxyactein | 124 |
| 4. Wirkung am Serotoninrezeptor 5-HT 7..... | 128 |
| E. Zusammenfassung | 131 |
| F. Summary..... | 133 |
| G. Abbildungsverzeichnis | 135 |
| H. Tabellenverzeichnis | 139 |
| I. Literaturverzeichnis | 141 |
| J. Danksagung..... | 147 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------------------|------------|
| K. Publikationen | 149 |
| L. Lebenslauf..... | 151 |
| M. Anhang..... | 153 |
| N. Erklärung | 169 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------|---|
| 5-HT 7 | 5-Hydroxytryptamin 7 Rezeptor |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| APCI | atmospheric pressure chemical ionisation |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCS | Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem (<i>“biopharmaceutics classification system“</i>) |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| Caco | (humane) Colon Carcinomzellen |
| CAL | Calibration Proben |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| Conc | concisa (geschnitten) Droge |
| CRS | chemical reference substance |
| DAD | Diodenarraydetektor |
| DEA | 27-Deoxyactein |
| DEV | Droge-Extrakt-Verhältnis |
| DMEM | <i>“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”</i> |
| EC 50 | mittlere effektive Konzentration |
| ELSD | evaporative light scattering detector |
| ER α | Östrogen Rezeptor α |
| ER β | Östrogen Rezeptor β |
| ESI | electrospray ionisation |
| FaSSIF | simulierte Intestinalflüssigkeit im nüchternen Zustand (<i>„fasted state simulated intestinal fluid“</i>) |
| FCS | Fötales Kälberserum (<i>„fetal calf serum“</i>) |
| FeSSIF | simulierte Intestinalflüssigkeit im Zustand nach der Nahrungsaufnahme (<i>„fed state simulated intestinal fluid“</i>) |
| GMP | Gute Herstellungspraxis (Good manufacturing practice) |
| HEPES | N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| HF | hydrophile Fraktion |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| HPTLC | high performance thin layer chromatography |
| HTRF | homogenous time resolved fluorescence |
| IC 50 | mittlere inhibitorische Konzentration |
| LC-ToF/MS | liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|------|--|
| LF | lipophile Fraktion |
| LLE | flüssig-flüssig Extraktion (liquid-liquid extraction) |
| LLOD | Detektionslimit („ <i>lower limit of detection</i> “) |
| LLOQ | unteres Quantifizierungslimit („ <i>lower limit of quantification</i> “) |
| MS | Massenspektrometrie |
| MT | Matrix effect Proben |
| NEAA | nicht essentielle Aminosäuren |
| Papp | Permeabilitätskoeffizient |
| PBS | „Phosphate Buffered Saline“ |
| PC | Phosphatidylcholin |
| PCA | principal component analysis |
| PGP | P-Glykoprotein |
| Pulv | pulverisierte Droge |
| QC | Quality control Proben |
| qCT | quantitative computed tomography |
| REC | Recovery Proben |
| SC | Säulenchromatographie |
| SEL | Selectivity Proben |
| TEER | Transepithelialer elektrischer Widerstand („ <i>transepithelial electrical resistance</i> “) |
| TLC | thin layer chromatography |
| TOT | trend over time Proben |
| ULOQ | oberes Quantifizierungslimit („ <i>upper limit of quantification</i> “) |
| XIC | extracted ion chromatogram |

A. Einleitung und Zielsetzung

1. *Actaea racemosa* L. [syn. *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT.]

1.1. Geschichte *Actaea racemosa*

Actaea (Traubensilberkerze) galt als eine alte Arzneidroge der Indianer Kanadas, Wisconsin und Missouri, die sie gegen die Folgen von Schlangenbissen und zur Geburtserleichterung gebrauchten, worauf die amerikanischen Volksnamen «snakeroot» und «squawroot» deuten [1]. Ende des 17. Jahrhunderts wurde sie botanisch zuerst von Morrison beschrieben, der ihr den Namen *Christophoriana canadensis* gab [2]. 1743 empfahl Colden in einer schwedischen Zeitschrift die Wurzeln in Kataplasmaform zur Zerteilung zirröser Geschwüre, worauf sie Linné als *Actaea racemosa longissima* in seine *Materia medica* aufnahm. Im 19. Jahrhundert wurde die Heilpflanze durch Garden im ärztlichen Gebrauch bekannt und galt als eine Art Wundermittel zur Behandlung von Lungenschwindsucht, fieberhaftem Rheumatismus und Chorea (Veitstanz) [3, 4]. Simpson, Varies und Davis nannten sie als Spezifikum bei Rheuma und Chorea, während Colvin und Knox für ihren Gebrauch als Wehen anregendes Mittel eintraten. Weil sie den damaligen Gepflogenheiten entsprechend meistens zu hoch dosiert wurde, war der Gebrauch der Heilpflanze aber häufig begleitet von unangenehmen Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen oder Übelkeit [5].

Möglicherweise lag es an diesen Nebenwirkungen, dass die Traubensilberkerze als Heilpflanze in Europa bald wieder in Vergessenheit geriet.

Über die Prüfung des homöopathischen Arzneimittelbildes erhielt es seinen Ruf als wichtiges Mittel bei Frauenleiden.

Heutzutage wird die Silberkerze in der Volksmedizin und in der Homöopathie unter anderem bei Arthritis, Bronchieninfektionen, Depressionen, Kopfschmerzen, Magen- und Darmschmerzen, Menstruationsbeschwerden, Rheuma und Wechseljahresbeschwerden verwendet [1, 6-8].

Als Trockenextrakt Zubereitung in Fertigarzneimitteln wird die Traubensilberkerze, erfolgreich und wissenschaftlich belegt, zur Linderung von Wechseljahresbeschwerden eingesetzt [9-13]. Die Anwendungsgebiete umfassen Hitzewallungen und Schweißausbrüche, psychische Beschwerden, Schlafstörungen, Störungen der Blase und Harnwege sowie die Prophylaxe bei der Entwicklung einer menopausalen Osteoporose.

1.2. Systematik und Taxonomie

Die Gattung *Actaea* gehört zu der Familie der Ranunculaceae (Hahnenfußgewächse) und ist vorwiegend im nordamerikanischen und asiatischen Raum zu finden. Die Pflanzengattung gliedert sich in unterschiedliche Spezies, welche überwiegend im asiatischen Raum beheimatet sind. Diese sind unter anderem *A. heracleifolia*, *A. dahurica*, *A. simplex*, *A. japonica*, *A. Cimicifuga* [syn. *Cimicifuga foetida* L.] und *A. podocarpa* [syn. *Cimicifuga americana* L.].



Abb. 1 *Actaea racemosa* - Das Kraut. Links die Pflanze; rechts oben der traubige Blütenstand; rechts unten die Blüte (Quelle: commons.wikimedia.org; Urheberrecht frei).

In Europa wird ausschließlich *A. racemosa* L. [syn. *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt.] in pflanzlichen Arzneimitteln verwendet. Zu dieser Art existieren zahlreiche klinische Daten zur Wirksamkeit bei klimakterischen Beschwerden sowie prämenstruellen Schmerzen und Dysmenorrhoe [14-18]. In vielen Ländern werden Nahrungsergänzungsmittel mit *Actaea*

angeboten. Die meisten dieser Produkte enthalten Genera aus dem asiatischen Raum, für welche keine klinisch validierten Studien zur Wirksamkeit verfügbar sind.

A. racemosa ist im östlichen Nordamerika, von Ontario bis Georgia und westlich bis Missouri, beheimatet. Im Verlauf der letzten zwei Jahrhunderte hat sich die Pflanze auch in Europa angesiedelt und verbreitet. In der Literatur finden sich für *A. racemosa* eine Reihe von Synonyma, darunter *Cimicifuga racemosa*, Wanzenkraut, black snakeroot (engl.), black cohosh (engl.), Frauenwurzel und *Christophoriana canadensis racemosa* [19-21]. Der gebräuchlichste deutsche Pflanzename lautet Traubensilberkerze. Die Drogenbezeichnung Frauenwurzel oder Schlangewurzel leitet sich aus der Verwendung ab. Im englischsprachigen Raum wird sowohl Pflanze als auch Droge als black cohosh bezeichnet.

1.3. Botanik und Pflanzenmorphologie

A. racemosa ist eine mehrjährige, krautige Staude mit einem bis zu 2 m hohen aufrechten Stängel, der aus einem dichtbewurzelten Rhizom erwächst. Die Blätter sind dreifach gefiedert; die endständigen Fiederblätter sind dreilappig, 6 – 15 cm lang, 6 - 16,5 cm breit und haben drei von der Basis ausgehende Hauptadern. Die anderen Fiederblätter sind eiförmig-lanzettlich, 4 – 12 cm lang, 3 – 8 cm breit, unbehaart oder selten an der Unterseite der Blattadern flaumig behaart. Die Blattränder sind gezähnt bis tief eingeschnitten. Die kleinen, weißen Blüten stehen in einem langen, schmalen, aus mehreren traubigen Teilblütenständen zusammengesetzten Blütenstand [19, 20].

Die Blütenhülle besteht aus vier grünlich-weißen Kelchblättern und sehr kleinen Kronblättern, die beim Aufblühen sofort abfallen. Die Blütenblätter sind sehr klein und kürzer als die zahlreichen Staubblätter (55 – 110 Stück). Die Blüte besitzt einen Stempel mit oberständigen Fruchtknoten mit einer Blütezeit von Juni bis September. Der unangenehme Geruch der Blüten vertreibt einige Insektenarten, darunter Wanzen. Diese Beobachtung hat der Gattung ihren Namen gegeben: lat. cimex = Wanze und lat. fuga = Flucht [21]. Es entwickeln sich eiförmige, 5 – 10 mm lange Balgfrüchte, die zahlreiche braun-schwarze, flache Samen enthalten.

Als Droge dient der getrocknete, nach der Fruchtreife gesammelte und zerschnittene Wurzelstock mit den Wurzeln. Das ganze Rhizom ist bis zu 15 cm lang, 0,5 – 3 cm im Durchmesser, dunkelbraun, knotig und etwas geringelt. Auf der Oberseite befinden sich rundliche, oft kelchförmige Narben und Reste der früheren Stängel. An der Unterseite ist der

Wurzelstock mit dünnen, längsfurchigen, dunkelbraunen, 3 – 16 cm langen und 1 – 5 mm breiten Wurzeln besetzt, die leicht abbrechen. Der getrocknete Wurzelstock weist einen hornigen, faserigen Bruch auf [19].

Die Schnittdroge ist gekennzeichnet durch dunkelbraune, unregelmäßig geformte Rhizome, die im Querschnitt meist rund sind und ein dunkelbraunes, wachsartiges Mark mit einem Durchmesser von 3 – 5 mm aufweisen. Das dunkelbraune 4 – 5 mm dicke Holz, in dem sich Keile des Xylems mit Markstrahlen abwechseln, wird von einer dunkelgrünen oder braunen 1 mm schmalen Rinde umgeben. Die dünnen Wurzeln sind im Querschnitt rund und zeigen eine dunkelbraune bis schwarze Rinde um das sternförmige, hellbraune oder gelbe Holz. Der Wurzelstock hat einen eigenartigen, muffigen, stechenden unangenehmen Geruch und einen bitteren, scharfen, adstringierenden Geschmack.

1.4. Morphologie Rhizoma

Die Botanik bezeichnet ein Rhizom (griechisch: ῥίζωμα = rhizoma „Eingewurzelt“) als ein meist unterirdisch oder dicht über dem Boden wachsendes Sprossachsensystem.

In der Pharmazie wird ein Rhizom als Teil einer Heilpflanze bezeichnet. Im allgemeinen Sprachgebrauch spricht man auch von einem Wurzelstock (Rhizoma), diese Bezeichnung ist jedoch irreführend, da ein Rhizom keinerlei Wurzelmerkmale besitzt. Als Teil des Sprosssystems besitzt ein Rhizom dessen typische Merkmale, wie kurze verdickte Internodien, Blattnarben sowie eine zum Spross identische Anordnung der Leitbündel. Zusätzlich verfügen Rhizome über keine Kalyptra im Vergleich zu Wurzeln [22].

Von dem Rhizom gehen nach unten die eigentlichen Wurzeln, nach oben die Triebe der Blätter aus. Oft ist ein Rhizom von schuppigen Niederblättern umgeben, in denen Reservestoffe gespeichert sind.

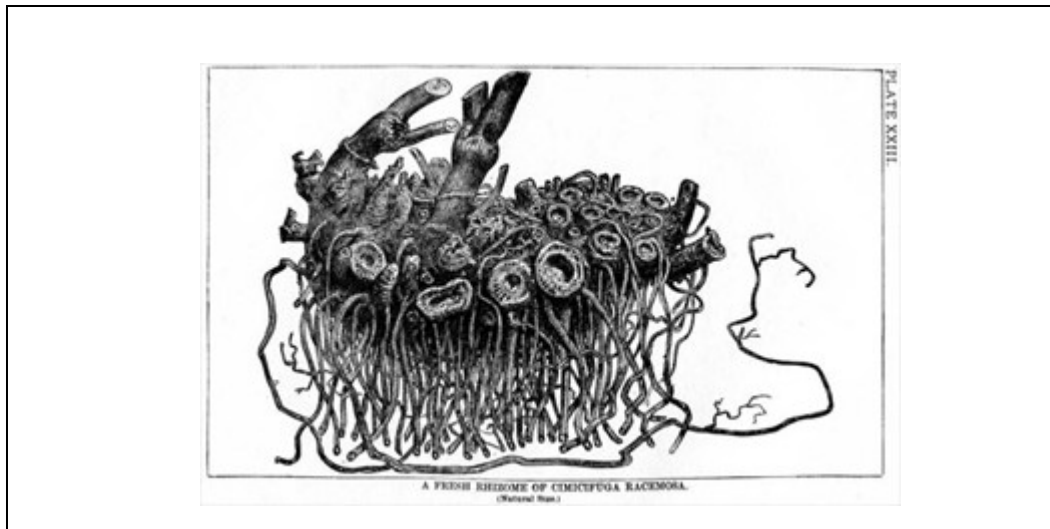


Abb. 2 *Actaea racemosa* - Das Rhizom [23]

1.5. Ernte

Traditionell wird *A. racemosa* erst geerntet, wenn die Pflanze fortpflanzungsfähig ist, was bei kultivierten Pflanzen je nach Anbautechnik nach 2 bis 8 Jahren der Fall ist. Rhizom und Wurzeln sollten im Herbst gesammelt werden wenn die Pflanze untätig ist, da zu dieser Zeit der Wassergehalt der unterirdischen Organe niedriger ist als in den anderen Jahreszeiten. Die Ernte im Herbst erlaubt den Pflanzen zudem reife Samen zu produzieren bevor sie entwurzelt werden. Ein Teil des Rhizoms mit einer sichtbaren Knospe sollte in der Erde zurückgelassen werden, damit es im folgenden Jahr wieder wächst.

A. racemosa kann in Kultur durch Aussaat oder Rhizomteilung vermehrt werden. Wächst die Pflanze aus Rhizomteilen ist sie nach 2 bis 3 Jahren fortpflanzungsfähig; wächst sie aus im Gewächshaus gesäten Samen und wird eingepflanzt dauert es 4 - 6 Jahre; direkt gesäte Pflanzen brauchen 6-8 Jahre.

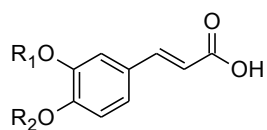
Die Aufarbeitung beginnt sofort nach der Ernte mit dem gründlichen Waschen der Rhizome und Wurzeln. Sie werden dann zum Trocknen ausgelegt und anschließend bei 35 – 45 °C geschnitten und luftgetrocknet. Sie sind vollständig trocken, wenn die Stücke leicht brechen und keine Feuchtigkeit mehr ersichtlich ist. Die Verpackung erfolgt in luftdichten Behältnissen, die vor Licht, Wärme, Feuchtigkeit und Insektenbefall geschützt sind. Für den Anbau, die Ernte und Lagerung ist die *Guideline on good agricultural and collection practice (GACP) for starting materials of herbal origin* der *European Medicines Agency* zu beachten [24].

1.6. Inhaltsstoffe

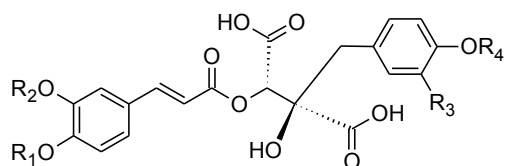
Die Inhaltsstoffe von *A. racemosa* können in 4 Gruppen eingeteilt werden, wobei in einer Rhizomdroge die Inhaltsstoffgruppe der Kohlenhydrate mengenmäßig den größten Anteil ausmacht. Die weiteren Stoffgruppen teilen sich in Phenylpropanoide, Triterpenglycoside und Alkaloide auf, die im Weiteren näher beschrieben werden [25].

EINLEITUNG

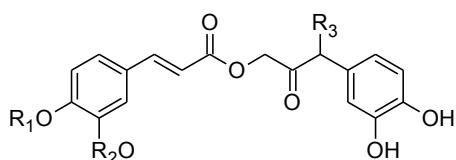
Strukturformeln



- 1 R1 = R2 = H: Caffeic acid
- 2 R1 = Me, R2 = H: Ferulic acid
- 3 R1 = H, R2 = Me: Isoferulic acid

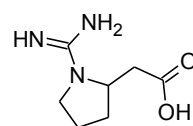


- 4 R1 = R2 = H, R3 = OH, R4 = H: Fukinolic acid
- 5 R1 = H, R2 = Me, R3 = OH, R4 = H: Cimicifugic acid A
- 6 R1 = Me, R2 = H, R3 = OH, R4 = H: Cimicifugic acid B
- 7 R1 = R2 = R3 = R4 = H: Cimicifugic acid D
- 8 R1 = Me, R2 = R3 = R4 = H: Cimicifugic acid E
- 9 R1 = H, R2 = Me, R3 = R4 = H: Cimicifugic acid F
- 10 R1 = Me, R2 = Me, R3 = OH, R4 = H: Cimicifugic acid G

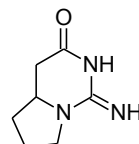


- 11 R1 = Me, R2 = R3 = H: Cimicifugic acid H
- 12 R1 = H, R2 = Me, R3 = H: Cimicifugic acid I
- 13 R1 = Me, R2 = H, R3 = OMe: Cimicifugic acid J
- 14 R1 = H, R2 = Me, R3 = OMe: Cimicifugic acid K
- 15 R1 = R2 = H: Petasiphenon

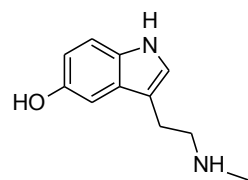
Abb. 3 Strukturformeln der Inhaltsstoffe in *A. racemosa* Teil 1



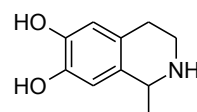
16 Cimipronidine



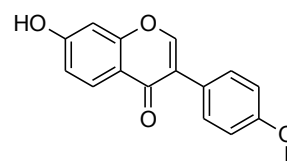
17 Cyclocimipronidine



18 *N*ω-Methylserotonin

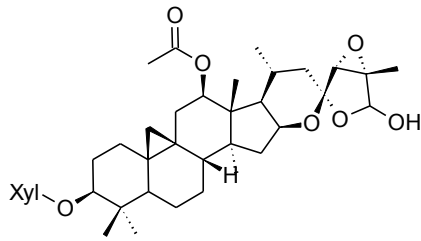


19 Salsolinol

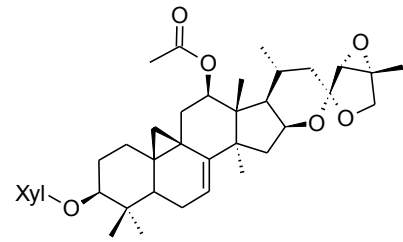


20 Formononetin

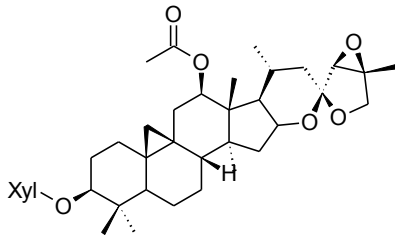
EINLEITUNG



21 Acteine

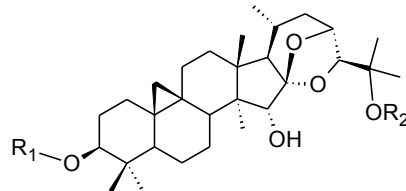


27 26-Deoxycimicifugoside



22 R = xyloside: 27-deoxyacteine

23 R = arabinoside: Cimircemoside N



28 R1 = xyloside, R2 = H: Cimigenol-3-O- β -D-xylopyranoside

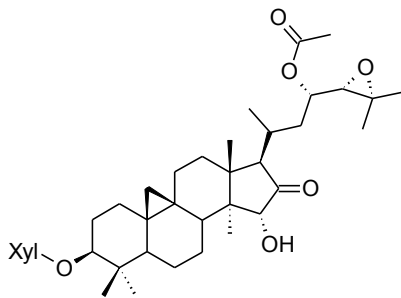
29 R1 = arabinoside, R2 = H: Cimircemoside C

30 R1 = xyloside, R2 = Ac: 25-O-Acetylcimigenol-3-O- β -D-xyloside

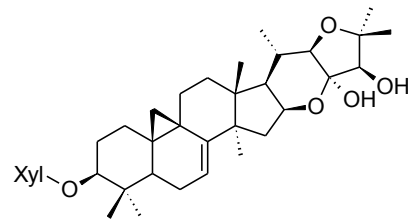
31 R1 = arabinoside, R2 = Ac: 25-O-Acetylcimigenol-3-O- α -L-arabinoside

32 R1 = xyloside, R2 = Me: 25-O-Methylcimigenol-3-O- β -D-xyloside

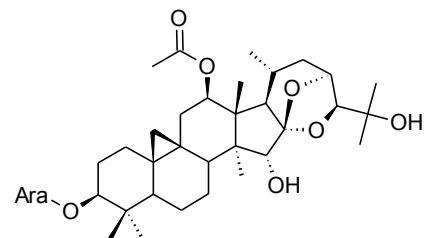
33 R1 = arabinoside, R2 = Me: 25-O-Methylcimigenol-3-O- α -L-arabinoside



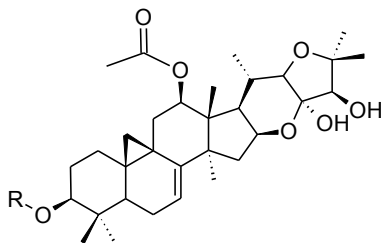
24 23-O-Acetylshengmanol-3-O- β -D-xylopyranoside



34 Cimiaceroside A

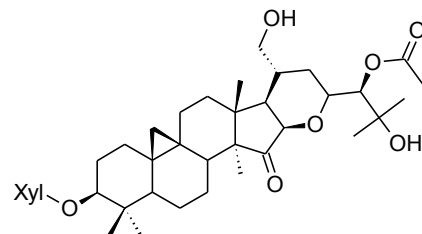


35 Cimircemoside D



25 R = xyloside: Cimircemoside F

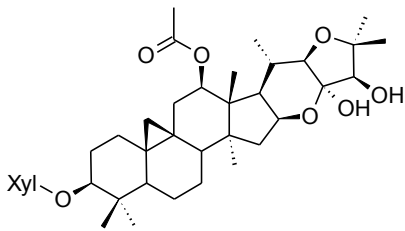
26 R = arabinoside: Cimircemoside G



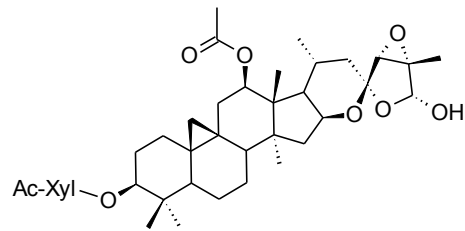
36 Cimircemoside E

Abb. 4 Strukturformeln der Inhaltsstoffe in *A. racemosa* Teil 2

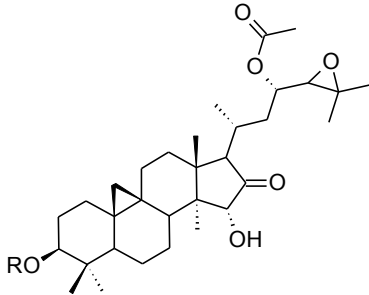
EINLEITUNG



37 Cimracemoside H

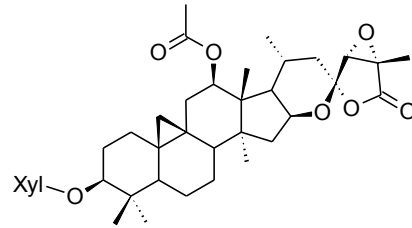


43 Cimracemoside O

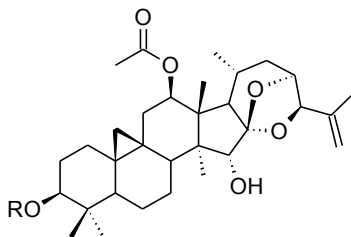


38 R = acetylarabinoside: Cimracemoside L

39 R = acetylxyloside: Cimracemoside M

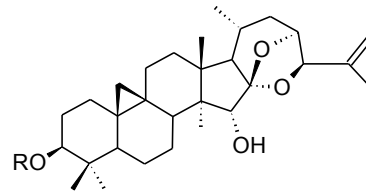


44 Cimracemoside P



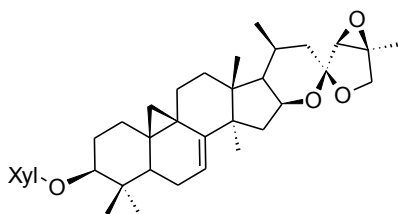
40 R = arabinoside: Cimracemoside J

41 R = xyloside: Cimracemoside K



45 R = arabinoside: 25-O-Anhydrocimigenol-arabinoside

46 R = xyloside: 25-O-Anhydrocimigenol-xyloside



42 Cimracemoside I

Abb. 5 Strukturformeln der Inhaltsstoffe in *A. racemosa* Teil 3

1.6.1. Kohlenhydrate

Rhizome sind weitreichend bekannt als Speicherorgane der Pflanze. Sie dienen zur vegetativen Vermehrung und zur Speicherung von Reservestoffen (z.B. Stärke und Inulin). Somit ist es nicht verwunderlich, dass sich bis zu 60 % Kohlenhydrate in *A. racemosa* wiederfinden lassen. Den größten Anteil hierbei hat das Disaccharid Saccharose (47) gefolgt

EINLEITUNG

vom Monosaccharid Glucose (48). Die weiteren identifizierten Reservestoffe sind Fructose (49), myo-Inositol (50) und das Trisaccharid Raffinose (51) (Abb. 6) [26].

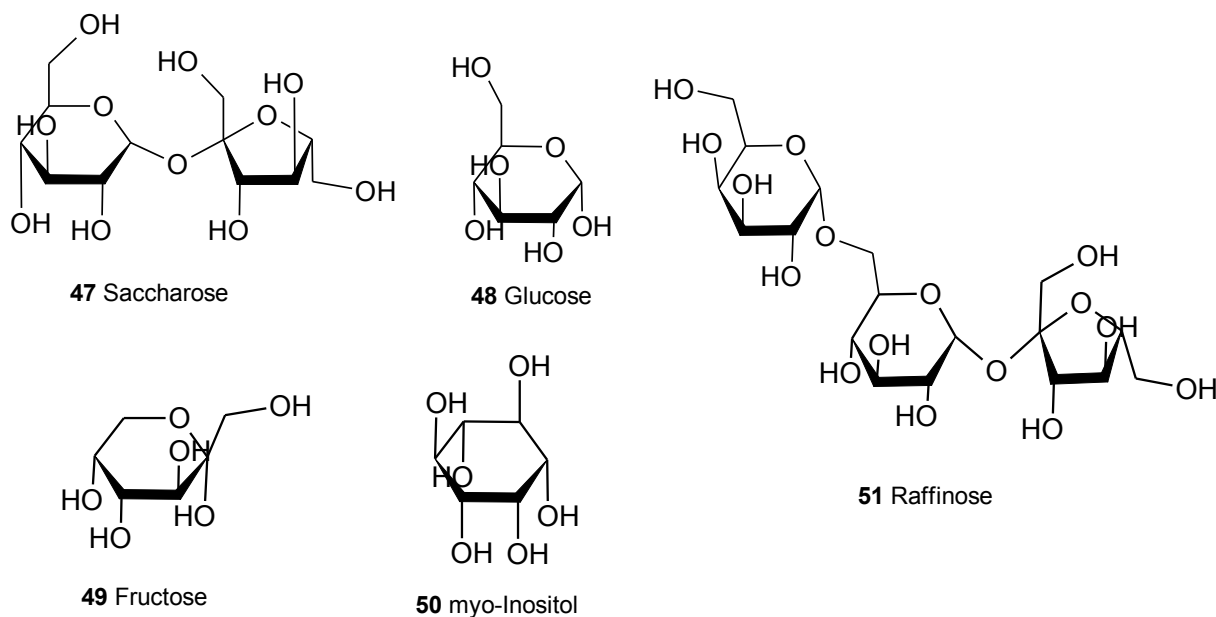


Abb. 6 Strukturformeln der detektierten Kohlenhydrate in *A. racemosa*

1.6.2. Phenolische Verbindungen

Das Vorkommen von Hydroxyzimtsäurederivaten ist für *Actaea racemosa* sehr gut beschrieben und charakteristisch für diese Heilpflanze [27, 28].

Einfache phenolische Verbindungen, hauptsächlich Ester der Kaffeesäure (1) wie Ferula- (2), und Isoferulasäure (3) sind beschrieben. Aber auch Dihydroxyzimtsäurederivate mit einem phenolischen Bicarbonsäurealkohol der Fukiinsäure oder Piscidinsäure sind charakteristische Inhaltsstoffe der Rhizomdroge. Hierzu gehören die Fukinolsäure (4) und die Cimicifugasäuren (5-10) sowie die Dihydroxyphenylcarbonsäureester in der Literatur auch bekannt als Cimiracemate [29].

1.6.3. Triterpenglycoside

Eine der Hauptinhaltsstoffgruppen von *A. racemosa* sind die C₃₀-Triterpenglycoside vom 9,19 Cycloartan-Typ (21-42), die biogenetisch dem Cycloartenol nahe stehen. Charakteristisch für diese Verbindungen ist ein Cyclopropanring, der durch die C-Atome C₉, C₁₀ und C₁₉ gebildet wird (Abb. 7). Unterschiede bestehen hingegen vor allem bei der Struktur des E-Rings. Die Zuckercomponenten sind unter anderem β-D-Xylose und α-L-Arabinose. Die Hauptverbindungen dieser Inhaltsstoffgruppe sind das Actein (21),

27-Deoxyactein (**22**), Cimigenolxylopyranosid (**28**) sowie das 26-Deoxycimicifugosid (**27**). Daneben sind die Cimiracemoside und die Triterpene vom Shengmanol-, und Cimigenol-Typ zu nennen [30-33].

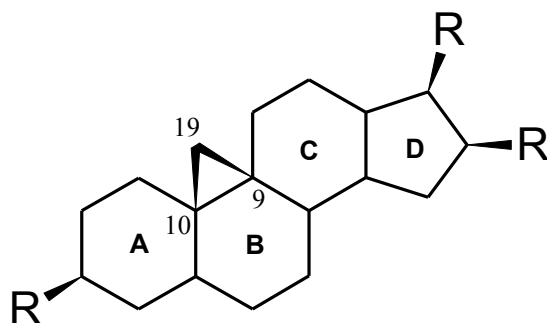


Abb. 7 Grundstruktur des 9, 19 Cycloartan Typ

1.6.4. Alkaloide

Eine Nebengruppe nehmen die N-haltigen Verbindungen ein. Unter anderem sind die Alkaloide Cimipronidin (**16**) und Cyclocimipronidin (**17**) beschrieben [34]. Powell S. L., und Godecke T. et. al. identifizierten Pictet-Spengler-Addukte sowie das in dieser Arbeit ebenfalls identifizierte N ω -Methylserotonin (**18**) [35, 36].

Die Gruppe der Alkaloide gehört in der Arzneipflanze zu den Nebeninhaltsstoffen, die nur in sehr geringen Mengen enthalten sind, jedoch sind einige dieser Verbindungen am serotonergen und dopaminergen System hoch wirksam, so dass durch diese Stoffgruppe eine Wirkungsweise von *A. racemosa* zu erklären sein könnte.

2. Symptomatik der Menopause

Wechseljahresbeschwerden zeigen ein komplexes Symptomenbild aus psychischen Symptomen und solchen, die das vegetative Nervensystem betreffen. Über das vegetative Nervensystem werden lebenswichtige Funktionen wie Herzschlag, Atmung, Blutdruck, Verdauung und Stoffwechsel kontrolliert [37].

Etwa ab dem 40. Lebensjahr verändert sich der weibliche Hormonhaushalt. Zuerst sinkt der Spiegel des Hormons Gestagen langsam ab, gefolgt von einer reduzierten Östrogenproduktion. Der Körper reagiert auf die ständig schwankenden Hormonwerte zunächst mit Unregelmäßigkeiten des Zyklus (z. B. verspätete oder verfrühte Regelblutung), sowie Schlaf- und Konzentrationsstörungen [38].

EINLEITUNG

Die erste Phase der Wechseljahre wird als Prämenopause bezeichnet. Bei zunehmendem hormonellem Ungleichgewicht treten Symptome wie Hitzewallungen und Schweißausbrüche auf, die häufig als die „typischen Wechseljahresbeschwerden“ beklagt werden.

Als Menopause wird der Zeitpunkt der letzten spontanen Menstruation im Leben einer Frau bezeichnet, der retrospektiv betrachtet keine ovariell ausgelöste Blutung aus der Gebärmutter mehr folgt, womit die Fruchtbarkeit der Frau beendet ist. Erst wenn ein Jahr ohne weitere Blutung vergangen ist, kann man sicher sein, dass man diese Phase wirklich erreicht hat. Vorher besteht noch immer die Möglichkeit, dass man schwanger werden kann [38].

Das Jahrzehnt nach der letzten Monatsblutung nennt man Postmenopause. Auch wenn jetzt keine Schwangerschaft mehr eintreten kann, finden weitere hormonelle Umstellungen statt. Wenn sich der Körper erfolgreich auf die deutlich niedrigeren Hormonwerte eingestellt hat, sieht man die Wechseljahre als beendet an.

Zwar sind Östrogene vor allem an der Steuerung des weiblichen Zyklus beteiligt, sie sind aber auch für eine Reihe weiterer Aufgaben wichtig: Struktur- und Feuchtigkeitsgehalt der Haut, Stabilität der Knochen, Vorbeugung von Gefäßverkalkung und die Freisetzung anderer Hormone. Dies erklärt, dass die Wechseljahre nicht nur das Ausbleiben des Menstruationszyklus zur Folge haben, die veränderte Hormonsituation kann zu Beschwerden führen, die sich erst nach Jahren z. B. als Osteoporose und Arteriosklerose bemerkbar machen [39].

Nicht jede Frau nimmt ihre Wechseljahre als beschwerliche Zeit wahr. Etwa jede 5. Frau hat keine Probleme körperlicher und seelischer Art. Bei den anderen 80 % tritt jedoch eine variable Bandbreite von leichten bis quälenden Symptomen auf. Die wichtigsten Veränderungen während der Wechseljahre sind im Folgenden aufgeführt [38, 40]:

- **Hitzewallungen und Schweißausbrüche**

Sie sind die bekanntesten und häufigsten Symptome, die man mit dem Begriff „Wechseljahre“ verbindet. Die einzelnen Schübe können bis zu 20 Mal am Tag auftreten und sind oft mit heftigem Schwitzen verbunden.

- **Schlafstörungen**

Schlechtes Einschlafen, mehrfaches nächtliches Erwachen, sowie Veränderungen der Schlaftiefe treten auf. Der resultierende Schlafmangel kann die körperliche

EINLEITUNG

Leistungsfähigkeit beeinträchtigen und zu Erschöpfung, Nervosität und Reizbarkeit führen.

- **Psychische Beschwerden**

Sie kommen als wahrscheinlich häufigste Wechseljahresbeschwerden vor und können von Stimmungsschwankungen über Ängste, Nervosität und Reizbarkeit bis hin zu depressiven Verstimmungen reichen. Die Lebensqualität der betroffenen Frauen wird stark beeinträchtigt.

- **Konzentration**

Die hormonellen Veränderungen haben auch Auswirkungen auf das Gehirn. Eine nachlassende Konzentrationsfähigkeit bzw. verminderte geistige Leistungsfähigkeit kann eine der Folgen sein.

- **Sexuelle Störungen**

Die natürlichen Veränderungen an den weiblichen Geschlechts- und Fortpflanzungsorganen als Folge der verringerten Wirkung der weiblichen Hormone können Beschwerden verursachen. Die vaginale Schleimhaut ist trockener und anfälliger für Verletzungen und Entzündungen.

- **Störungen der Blase und Harnwege**

Die Harnwege sind durch die verringerte Östrogenwirkung von Gewebeveränderungen betroffen. In den Wechseljahren kann es zu einer Verminderung der Dehnungsfähigkeit der Blase und zu einer reduzierten Verschlusskraft des Schließmuskels kommen. Harnwegsinfektionen und unwillkürlicher Harnabgang sind die oftmals die Folge.

- **Osteoporose**

Osteoporose ist eine Verminderung der Knochenmasse und -dichte, aus der vermehrte Knochenbrüche resultieren können. Aufgrund der hormonellen Veränderung entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Osteoklasten und Osteoblasten, was zur Folge hat, dass mehr Knochenmasse ab- als aufgebaut wird.

EINLEITUNG

Weitere körperliche Beschwerden wie Schwindel, Herzklopfen, Verstopfung und eine Gewichtszunahme können ebenfalls zu den Beschwerden im Klimakterium zählen. Zudem kann durch die sinkenden Spiegel der Östrogene die Gefahr von Gefäßveränderungen steigen.

3. Zielsetzung der Arbeit

Das Anwendungsgebiet für Trockenextrakte aus *A. racemosa* umfasst den weitreichenden Symptomenkomplex des Klimakteriums der Frau. Der Wirkmechanismus der Pflanze wurde eingehend untersucht und viele Studien stützten sich auf ein direktes östrogenes Wirkprinzip, beeinflusst durch die Wirkung an Östrogen Rezeptoren ER α und ER β [41]. Neue Erkenntnisse zeigen jedoch, dass *Actaea racemosa* nicht direkt den Hormonhaushalt steuert, sondern indirekt daran beteiligt ist [42, 43]. Gleichzeitig zeigt die Pflanze *in vitro* auch zentrale Wirkungseigenschaften [35, 44].

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine umfassende Charakterisierung der Inhaltsstoffe in *Actaea racemosa* durchgeführt werden. Der analytische Teil dieser Arbeit bearbeitet einerseits die Fragestellung des geeigneten Extraktionsmittels für die Droge, im Weiteren wird ein ethanolscher Trockenextrakt in 6 Unterfraktionen aufgetrennt, wodurch der Gesamtextrakt mit Hilfe unterschiedlichster analytischer Messmethoden qualitativ und quantitativ charakterisiert werden soll. Es soll eine Methode zur Quantifizierung der Gesamtheit der Triterpenglycoside mittels Lichtstreuungsdetektion entwickelt werden, sowie eine Methodvalidierung einer LC-ToF/MS Methode für die Quantifizierung von 27-Deoxyactein durchgeführt werden.

Der pharmakologische Aspekt der Arbeit besteht unter anderem darin, die hergestellten Fraktionen in einem Rattenmodell auf ihre Wirksamkeit zur Hemmung der Entwicklung einer Osteoporose bei der ovariectomierten Ratte zu untersuchen.

Im zweiten pharmakologischen Teil der Arbeit wird der Frage potentieller Absorptionseigenschaften nach oraler Einnahme von *A. racemosa* nachgegangen, genauer gesagt, die Permeabilität von 27-Deoxyactein im Caco-2 Zellmodell untersucht. Mit Hilfe dieser Zelllinie kann *in vitro* die Absorption des Saponins aus dem Darmlumen in die Blutbahn simuliert werden.

Der dritte pharmakologische Teil beschäftigt sich mit der Affinität von *A. racemosa* am, für die Thermoregulation verantwortlichen, Serotonin-Rezeptor 5-HT₇. Mittels des zellbasierten Ligandenbindungsassays soll die serotonerge Wirksamkeit der Traubensilberkerze und damit ein möglicher Wirkungsmechanismus aufgeklärt werden.

B. Experimenteller Teil

1. Drogenmaterial

1.1. Herkunft und Ernte

Im Rahmen der Dissertation wurden verschiedene Chargen mit Rhizomen von *Actaea racemosa* L. [syn. *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT.] aus Wildsammlungen untersucht. Nachstehende Tabelle zeigt die verwendeten Drogenchargen sowie deren Herkunft und Erntezeitpunkt:

Tab. 1 Auflistung der verwendeten Drogenchargen mit dem Herkunftsland und dem Erntezeitpunkt

| Drogencharge | Herkunft | Erntezeitpunkt |
|---------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000049322 | Deutschland, Berlin | Mai 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000049324 | Deutschland, Berlin | Mai 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000049325 | Deutschland, Berlin | Mai 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000049326 | Deutschland, Berlin | Mai 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000049327 | Deutschland, Berlin | Mai 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000049520 | Deutschland, Berlin | Mai 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000049523 | Deutschland, Berlin | Mai 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000049529 | Deutschland, Berlin | Mai 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000050392 | Deutschland, Berlin | Juni 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000050393 | Deutschland, Berlin | Juni 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000050394 | Deutschland, Berlin | Juni 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000050395 | Deutschland, Berlin | Juni 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000050459 | Deutschland, Berlin | Juni 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000050570 | Deutschland, Berlin | Juni 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000050571 | Deutschland, Berlin | Juni 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000050579 | Deutschland, Berlin | Juni 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 0000050584 | Deutschland, Berlin | August 2010 |

EXPERIMENTELLER TEIL

| Drogencharge | Herkunft | Erntezeitpunkt |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000050589 | Deutschland, Berlin | August 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000050590 | Deutschland, Berlin | August 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000050591 | Deutschland, Berlin | August 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000050592 | Deutschland, Berlin | August 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000051565 | Deutschland, Berlin | September 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000051568 | Deutschland, Berlin | September 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000051575 | Deutschland, Berlin | September 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000051582 | Deutschland, Berlin | September 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000051666 | Deutschland, Berlin | August 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000051888 | Deutschland, Berlin | August 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000051889 | Deutschland, Berlin | August 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000051890 | Deutschland, Berlin | August 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000051891 | Deutschland, Berlin | August 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000051893 | Deutschland, Berlin | August 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000051895 | Deutschland, Berlin | August 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000051896 | Deutschland, Berlin | August 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000052053 | USA, Mittlerer Westen | Juni 2007 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000052085 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000052086 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000052091 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000053701 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000053702 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000053703 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000053704 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000053705 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000053937 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000053938 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000053939 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |

EXPERIMENTELLER TEIL

| Drogencharge | Herkunft | Erntezeitpunkt |
|---------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000053940 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000054119 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000054120 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000054122 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000054165 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000054166 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000054167 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000054169 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000054170 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000054514 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000054515 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000054516 | Deutschland, Berlin | Oktober 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060383 | Deutschland, Berlin | September 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060384 | Deutschland, Berlin | September 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060639 | Deutschland, Berlin | April 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060640 | Deutschland, Berlin | April 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060641 | Deutschland, Berlin | Mai 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060642 | Deutschland, Berlin | Mai 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060910 | Deutschland, Berlin | Juni 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060911 | Deutschland, Berlin | Juli 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060912 | Deutschland, Berlin | Juli 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060915 | Deutschland, Berlin | August 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060994 | Deutschland, Berlin | September 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060995 | Deutschland, Berlin | September 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060996 | Deutschland, Berlin | Oktober 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 0000060997 | Deutschland, Berlin | Oktober 2011 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 2406-01 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea rhizoma</i> Ch.: 2406-02 | Deutschland, Berlin | März 2010 |

EXPERIMENTELLER TEIL

| Drogencharge | Herkunft | Erntezeitpunkt |
|------------------------------------|---------------------|----------------|
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-03 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-04 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-05 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-06 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-07 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-08 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-09 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-11 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-13 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-14 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-15 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-16 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-17 | Deutschland, Berlin | März 2010 |
| <i>Actaea</i> rhizoma Ch.: 2406-18 | Deutschland, Berlin | März 2010 |

Die *Actaea racemosa*-Drogen wurden unter anderem auf den Gehalt an Triterpenglycosiden und $N\omega$ -Methylserotonin untersucht sowie im pharmakologischen Screening einer zellbasierten 5-HT₇ Rezeptorbindungsstudie eingesetzt (Kapitel C.3.3).

1.2. Drogenmaterial für Extraktionsverfahren

Für den Vergleich der Extraktionsmittel 2-Propanol gegen Ethanol wurden die *Actaea* rhizoma-Drogenchargen 0000026766, 0000026867 und 0000027838 eingesetzt.

Bei der Charge 0000026766 handelte es sich um eine Wildsammlung aus dem nordamerikanischen Raum. Die Droge wurde von Sommer bis Herbst nach der Blüte während der Ruhephase von Hand geerntet. Nach der Reinigung und technischen Trocknung bei < 60 °C wurde die Droge nach CO₂-Druckbehandlung trocken, kühl und unter Lichtschutz gelagert.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Charge 0000026867 stammt ebenfalls aus einer Wildsammlung aus den USA/Mittlerer Westen. Der Erntezeitpunkt war Mai/Juni 2007. Nach der natürlichen Freilufttrocknung wurde die Droge mittels Phosphorwasserstoff, PH_3 , begast und gelagert.

A. racemosa Charge 0000027838 stammte ebenfalls aus einer Wildsammlung in den USA. Die Ernte erfolgte zwischen Oktober und November 2007. Nach der Reinigung sowie künstlichen Trocknung wurden die Rhizome bis zur Auslieferung kühl und trocken gelagert. Mit diesen 3 Chargen wurden folgende Extraktionsansätze hergestellt:

- a: Geschnittene Droge (2800 - 4000 μm), Bewegungsmazeration 24 h bei RT
- b: Gepulverte Droge (500 μm), Bewegungsmazeration 24 h bei RT
- c: Geschnittene Droge (2800 - 4000 μm), Extraktion unter Rückfluss 30 min bei 90 °C
- d: Gepulverte Droge (500 μm), Extraktion unter Rückfluss 30 min bei 90 °C

Ein Vergleich der Extraktionsmittel Ethanol 58 % (v/v) und 2-Propanol 40 % (v/v) soll in dieser Arbeit durchgeführt werden. Die Ansätze wurden jeweils in doppelter Aufarbeitung durchgeführt. Das Droge-Extraktionsmittelverhältnis wurde auf 1:10 festgelegt.

1.3. Bionorica Spezialextrakt BNO 1055

Bei den Chargen 690253 (C001) und 690365 (C005) handelt es sich um Produktionschargen des Bionorica Spezialextraktes BNO 1055. Die Herstellung erfolgte unter GMP Bedingungen sowie nach der spezifischen Herstellungsanweisung der Bionorica SE, bei der nach einer 6 stündigen Bewegungsmazeration der wässrig ethanolische Extrakt in einem speziellen Vakuumtrockner bei einer Maximaltemperatur von 45 °C getrocknet wird.

Die beiden Extrakte wurden aus unterschiedlichem Drogeausgangsmaterial hergestellt und können damit als unabhängig betrachtet werden.

2. Chemikalien

2.1. Fraktionierungsprozess

| | |
|----------------------------|---|
| Milli-Q Millipore Wasser | Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Dichlormethan Emsure® | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumhydroxid-Lösung 25% | VWR International GmbH, Ismaning, Deutschland |
| Methanol gradient grade | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |

2.2. Chromatographie

| | |
|----------------------------|---|
| Milli-Q Millipore Wasser | Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Acetonitril gradient grade | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Ethanol gradient grade | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Methanol gradient grade | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Ethylacetat | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Ameisensäure 99 % - 100 % | BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland |
| Schwefelsäure 95 % - 97 % | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| 1-Butanol | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| 4-Methoxybenzaldehyd 98 % | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Methanol zur Analyse | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Essigsäure 96 % | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| 2-Propanol gradient grade | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Phosphorsäure 85 % | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |

2.3. Reinsubstanzen

| | |
|------------------------------|---|
| Isoferulasäure CRS | Phytolab GmbH, Vestenbergsgreuth, Deutschland |
| Monoammoniumglycerrhizat CRS | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| 27-Deoxyactein CRS | Phytolab GmbH, Vestenbergsgreuth, Deutschland |
| Formononetin CRS | Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland |
| Actein CRS | Universität Innsbruck, Pharmakognosie, Österreich |

EXPERIMENTELLER TEIL

| | |
|--|--|
| Cimigenol-3-O- β -D-xylopyranosid CRS | Universität Innsbruck, Pharmakognosie, Österreich |
| 23-O-Acetylshengmanol-3-O- β -D-xylopyranosid CRS | Universität Innsbruck, Pharmakognosie, Österreich |
| Cimiracemosid F CRS | Universität Innsbruck, Pharmakognosie, Österreich |
| 26-Deoxycimicifugosid CRS | LGC Standards, Wesel, Deutschland |
| Cimiracemosid C CRS | Universität Innsbruck, Pharmakognosie, Österreich |
| 25-O-Acetylcimigenol-3-O- β -xylosid CRS | CFM Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland |
| 25-O-Acetylcimigenol-3-O- α -L-arabinosid CRS | CFM Oskar Tropitzsch, Marktredwitz, Deutschland |
| 25-O-Methylcimigenol-3-O- α -L-arabinosid CRS | Universität Innsbruck, Pharmakognosie, Österreich |
| N ω -Methylserotonin CRS | Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland |

EXPERIMENTELLER TEIL

3. Allgemeine Laborgeräte

| | |
|----------------------|--|
| Analysenwaagen: | Sartorius ME 254S – 0CE, Sartorius AG, Göttingen Sartorius ME 235P – 0CE, Sartorius AG, Göttingen Mettler Toledo XP6002S, Mettler-Toledo GmbH, Gießen |
| Zentrifuge: | Rotanta 460 R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen |
| Trockenschrank: | Heraeus T6, Heraeus Instruments, Hanau |
| Ultraschallbad: | Branson 5210, Branson Ultraschall, Dietzenbach Bandelin Sonorex Super RK512H, Berlin |
| Ultra-Turrax: | MS1 Minishaker, Vortex 3, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| Rotationsverdampfer: | Rotavapor R-210, Büchi Labortechnik GmbH, Essen |
| Heizplatte: | Thermoplate S, Sarstedt AG & Co., Nürnbergrecht |
| Trockengerät: | SalonDry AC lite, Philips Deutschland GmbH, Hamburg |
| Mühle: | ZM 200, Retsch GmbH, Haan Pulverisette 2, Fritsch, Idar-Oberstein |
| Wasserbad: | Abdampf Wasserbad 1023, GFL GmbH, Burgwedel |
| Extrakttherstellung: | Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg Radleys Carousel 6 place reaction station, Büchi Labortechnik GmbH, Essen |
| Magnetrührer: | VMS-A, VWR international GmbH, Darmstadt |
| Pipettierhilfe: | Eppendorf Reference, Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf Multipette plus, Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf Multipette XStream, Eppendorf AG, Hamburg |
| Fraktionskollektor: | Isco Foxy 200, Teledyne Isco, Lincoln, United States |
| Gefriertrockner | SP Scientific Benchtop K, SP Industries, Warminster, USA |

4. Chromatographische Methoden

4.1. TLC

TLC-Methode 01

| | | | |
|---------------------|---|-------|--------------|
| Stationäre Phase: | HPTLC Kieselgel 60 F254, 10 x 20 cm, Fa. Merck, Darmstadt | | |
| Fließmittel: | Oberphase der Mischung aus | | |
| | 1-Butanol | 50 | Volumenteile |
| | Wasser | 25 | Volumenteile |
| | Ethylacetat | 12,5 | Volumenteile |
| Auftragegerät: | TLC Sampler 3, Camag, Muttenz, Schweiz | | |
| Auftragsvolumen: | Referenzlösung | 5 µL | |
| | Untersuchungslösung | 10 µL | |
| Referenzlösung: | 23-epi-26-Deoxyactein 0,6 mg/ml | | |
| | β-Aescin 1 mg/ml | | |
| Detektion: | Tauchen in modifiziertes Anisaldehyd-Reagenz, Auswertung erfolgt bei Tageslicht | | |
| Belichtungseinheit: | Reprostar 2, Camag, Muttenz, Schweiz | | |

TLC-Methode 02

| | | | |
|---------------------|---|------|--------------|
| Stationäre Phase: | HPTLC Kieselgel 60 F254, 10 x 20 cm, Fa. Merck, Darmstadt | | |
| Fließmittel: | Ethylacetat | 90 | Volumenteile |
| | Ameisensäure | 5 | Volumenteile |
| | Wasser | 5 | Volumenteile |
| Auftragegerät: | Desaga AS 30 | | |
| Auftragsvolumen: | Referenzlösung | 5 µL | |
| | Untersuchungslösung | 5 µL | |
| Detektion: | 366 nm | | |
| | Tageslicht und 254 nm nach Tauchen in modifiziertem Anisaldehyd-Reagenz | | |
| Belichtungseinheit: | Powershot G9, Canon Deutschland GmbH, Krefeld | | |

EXPERIMENTELLER TEIL

4.2. HPLC-UV

HPLC-Methode 01

HPLC System: Agilent 1200 Series, Agilent Technologies GmbH, Böblingen
bestehend aus Degaser, binäre Hochdruckpumpe, Autosampler,
Autosampler Thermostat, Säulenofen, Diodenarraydetektor

Säule: Phenomenex Prodigy ODS 3 100 Å, 5 µm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex,
Aschaffenburg

Fluss: 0,5 ml/ min

Fließmittel: A: Phosphorsäure 0,085 %
B: Acetonitril 100 %

Gradient: A/B (80/20; v/v) auf (70/30; v/v) in 30 min, 5 min Spülphase bei
(0/100 v/v), 7 min Equilibrierungsphase (80/20; v/v)

Injektionsvolumen: 10 µL

Detektion: UV: $\lambda = 330 \text{ nm}$

HPLC-Methode 02

HPLC System: Agilent 1200 Series, Agilent Technologies GmbH, Böblingen
bestehend aus Degaser, binäre Hochdruckpumpe, Autosampler,
Autosampler Thermostat, Säulenofen, Diodenarraydetektor

Säule: SeQuant ZIC-HILIC, 5 µm, 150 x 2,1 mm, Merck SeQuant, Umeå,
Sweden

Fluss: 0,750 ml/ min

Fließmittel: A: Ammoniumformiat 10 mM
B: Acetonitril 100 %

Gradient: A/B (3/97; v/v) auf (50/50; v/v) in 10 min, in 2 min auf (85/15; v/v),
3 min Spülphase bei (85/15; v/v), 5 min Equilibrierungsphase
(3/97; v/v)

Injektionsvolumen: 10 µL

Detektion: UV 1: $\lambda = 330 \text{ nm}$
UV 2: $\lambda = 275 \text{ nm}$

EXPERIMENTELLER TEIL

4.3. HPLC-ELSD

HPLC-Methode 03

HPLC System: Agilent 1200 Series, Agilent Technologies GmbH, Böblingen
bestehend aus Degaser, binäre Hochdruckpumpe, Autosampler,
Autosampler Thermostat, Säulenofen, Diodenarraydetektor

Säule: Phenomenex Synergi MAX-RP C 12, 4 µm, 150 x 4.60 mm,
Phenomenex, Aschaffenburg

Fluss: 1,0 ml/ min

Fließmittel: A: Ameisensäure 0,1 %
B: Acetonitril 100 %

Gradient: A/B (80/20; v/v) auf (70/30; v/v) in 1 min, 4 min halten, in 13 min auf
(40/60; v/v), 2 min Spülphase bei (0/100 v/v),
5 min Equilibrierungsphase (80/20; v/v)

Injektionsvolumen: 10 µL

Detektion: UV, $\lambda = 330$ nm
ELSD
Parameter: Verdampfungstemperatur: 40 °C; Signalverstärkung: 10;
Messzeit: 33 ms; Stickstoffdruck: 3,2 bar

4.4. Agilent HPLC-MS

HPLC-Methode 04

HPLC System: Agilent 1200 Serie LC-MS System, Agilent Technologies GmbH,
Böblingen
bestehend aus Degaser, quaternäre Hochdruckpumpe, Autosampler,
Autosampler Thermostat, Säulenofen, Diodenarraydetektor, Agilent
single Quadrupole 6130

Säule: Phenomenex Prodigy 5u ODS(3) 100A, 5 µm, 250 x 4,1 mm,
Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland

Fluss: 1 ml/ min

Fließmittel: A: Ameisensäure 0,1 %
B: Methanol 100 %

EXPERIMENTELLER TEIL

Gradient: A/B (97/3; v/v), in 18 min auf (77/23; v/v), in 7 min auf (55/45; v/v), in 15 min auf (40/60; v/v), in 35 min auf (0/100; v/v), 5 min halten, 10 min Equilibrierungsphase bei (97/3; v/v)

Injektionsvolumen: 20 μ L

Detektion: UV: $\lambda = 330$ nm
massenspektrometrisch

Parameter: Ionisierungsmodus: APCI; Verdampfungstemperatur: 350 °C; Corona Spannung: +/- 70 V; Massenbereich: 100 – 800 amu, Stickstofffluss: 3,5 bar

4.5. ABSciex API 5000 LC/MS/MS System

HPLC-Methode 05

HPLC System: Agilent 1290 Infinity LC System, Agilent Technologies GmbH, Böblingen
bestehend aus Degaser, quaternäre Hochdruckpumpe, Autosampler, Autosampler Thermostat, Säulenofen

Säule: Zorbax Eclipse XDB C18 2.1 x 50 mm 1.8 μ m column, Agilent Technologies GmbH, Germany

Fluss: 0,6 ml/ min

Fließmittel: A: Ameisensäure 0,1 %
B: Acetonitril 100 %

Gradient: A/B (70/30; v/v), in 2,5 min auf (50/50; v/v), in 1 min auf (0/100; v/v), 1,5 min halten, 1 min Equilibrierungsphase bei (70/30; v/v)

Injektionsvolumen: 1 μ L

Detektion: massenspektrometrisch

Parameter: Ionisierungsmodus: ESI; Turbogastemperatur: 500 °C; Ionisierungsspannung: +/- 4500 V; Massenbereich: 300 – 800 amu, Kollisionsgas: Stickstoff (3,0 x 10⁻⁵ Torr)

EXPERIMENTELLER TEIL

MRM-Übergänge:

| Substanz Nr. | Massenübergang Q1 → Q3 | Abspaltung [amu] | Retentionszeit [min] |
|--------------|----------------------------|---------------------|-------------------------|
| 18 | <i>m/z</i> 190.x → 160,x | 30 | 0.44 |
| 21 | <i>m/z</i> 699.x → 639,x | 60 | 7,0 |
| 22 | <i>m/z</i> 661.x → 451,x | 210 | 6.59 |
| 24 | <i>m/z</i> 663,3.x → 453,x | 210 | 6.9 |
| 25 | <i>m/z</i> 699.x → 639,x | 60 | 6.15 |
| 27 | <i>m/z</i> 659.x → 449,x | 210 | 6.33 |
| 28 | <i>m/z</i> 621.2 → 453,x | 168 | 8.1 |
| 29 | <i>m/z</i> 621,2 → 453,x | 168 | 7.9 |
| 30 | <i>m/z</i> 663,3 → 453,x | 210 | 8.8 |
| 31 | <i>m/z</i> 663,3 → 453,x | 210 | 8.68 |
| 33 | <i>m/z</i> 635.x → 453,x | 182 | 8.74 |

4.6. ABSciex tripleTOF 5600 System

HPLC-Methode 06

HPLC System: Agilent 1290 Infinity LC System, Agilent Technologies GmbH,
Böblingen

bestehend aus Degaser, quaternäre Hochdruckpumpe, Autosampler,
Autosampler Thermostat, Säulenofen

Säule: Zorbax Eclipse XDB-C18 2.1 x 50 mm 1.8 µm column, Agilent
Technologies GmbH, Germany

Fluss: 0,6 ml/ min

Fließmittel: A: Ameisensäure 0,1 %

B: Acetonitril 100 %

Gradient: A/B (70/30; v/v), in 2,5 min auf (50/50; v/v), in 1 min auf (0/100; v/v),
1,5 min halten, 1 min Equilibrierungsphase bei (70/30; v/v)

Injektionsvolumen: 1 µL

Detektion: massenspektrometrisch

Parameter: Ionisierungsmodus: ESI; Turbogastemperatur: 500 °C;

Ionisierungsspannung: +/- 4500 V; Massenbereich: 300 – 800 amu,

Kollisionsgas: Stickstoff (3,0 x 10⁻⁵ Torr)

HPLC-Methode 07

EXPERIMENTELLER TEIL

HPLC System: Agilent 1290 Infinity LC System, Agilent Technologies GmbH,
Böblingen
bestehend aus Degaser, quaternäre Hochdruckpumpe, Autosampler,
Autosampler Thermostat, Säulenofen

Säule: Zorbax Eclipse XDB-C18 2.1 x 50 mm 1.8 µm column, Agilent
Technologies GmbH, Germany

Fluss: 0,6 ml/ min

Fließmittel: A: Ameisensäure 0,1 %
B: Acetonitril 100 %

Gradient: A/B (95/5; v/v), 1 min halten, in 5 min auf (69/31; v/v), in 4 min auf
(0/100; v/v), 2 min halten, 2 min Equilibrierungsphase bei (95/5; v/v)

Injektionsvolumen: 1 µL

Detektion: massenspektrometrisch
Parameter: Ionisierungsmodus: ESI; Turbogastemperatur: 500 °C;
Ionisierungsspannung: +/- 4500 V; Massenbereich: 130 – 2000 amu,
Kollisionsgas: Stickstoff (3,5 x 10⁻⁵ Torr)

5. Fraktionierungsprozess

5.1. Liquid-liquid Extraktion

Der ethanolische Spezialextrakt BNO 1055 von *Actaea racemosa* rhizomae wurde in dieser Arbeit genauestens auf sein Inhaltsstoffprofil untersucht. Dafür war es nötig, den Trockenextrakt in verschiedene Fraktionen zu trennen, um einen umfassenden Überblick über die mehr als 60 Inhaltsstoffe zu bekommen.

Die Gewinnung der Saponin- und Wasserfraktion erfolgte mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) des *Actaea* Spezialextraktes BNO 1055 in Wasser gegen Dichlormethan. Dabei wurde der Trockenextrakt in einer Laborflasche mit Wasser in HPLC-Reinheit versetzt und für 15 Minuten bei 30 °C im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend, zwecks verbesserter Abtrennung der Phenylpropanoide, wurde das Gemisch mit Natronlauge auf einen pH von 8,5 eingestellt und mit dem gleichen Volumen Dichlormethan versetzt. Das Gemisch wurde in geschlossener Flasche für 1 Stunde bei 33 °C kräftig gerührt und anschließend in einen Scheidetrichter überführt.

Nach erfolgter Phasentrennung wurde die Unterphase (= Dichlormethanphase) gesammelt und die Oberphase (= Wasserphase) zusammen mit der entstandenen Grenzphase wieder in die Laborflasche überführt. Der Ausschüttelungsprozess wurde ein weiteres Mal wiederholt und die gewonnenen Dichlormethanphasen wurden vereint. Die wässrige (Rest-) Phase wurde getrennt gesammelt. Die entstandene Grenzphase wurde verworfen.

Die Qualität der Trennung wurde mittels Dünnschichtchromatographie (TLC Methode 02), siehe Kapitel C.2, überprüft. Durch anschließende Trocknung der Dichlormethanphase am Rotationsverdampfer wurde die getrocknete Saponinfraktion (LF) erhalten. Die getrocknete wässrige Phase, im Folgenden Restfraktion (HF) genannt, wurde mittels Lyophilisation gewonnen.

5.2. Präparative Chromatographie

Sowohl die lipophile- als auch die hydrophile Fraktion, die über flüssig-flüssig Extraktion gewonnen wurden, wurden über eine C 18 RP Silicagel gepackte Glassäule aufgegeben und anschließend mit steigender Methanol-Konzentration eluiert. Die L-Fraktion wurde in Methanol angelöst und nach Zugabe einer volumengleichen Menge Wasser die entstehende Suspension auf die Säule aufgegeben. Die Elution erfolgte mit steigenden Konzentrationen

EXPERIMENTELLER TEIL

von 50 % - 100 % (v/v) Methanol zu jeweils 1 L. Die Säule wurde anschließend mit 100 % Methanol mit Zusatz von 10 % (v/v) Ameisensäure gespült.

Die trockene Restfraktion wurde in 10 % (v/v) Methanol suspendiert und entsprechend der L-Fraktion auf die C 18 RP Kieselgelsäule aufgegeben. Die Chromatographie wurde mit 10 % bis 70 % (v/v) Methanol mit Zusatz von 10 % (v/v) Ameisensäure durchgeführt.

Über einen Fraktionskollektor wurden je ~ 20 ml Aliquotes gesammelt, die im Anschluss mittels Dünnschichtchromatographie untersucht wurden. Basierend auf den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie, siehe Kapitel C.2.1, wurden die Aliquotes der lipophilen Fraktion und der hydrophilen Fraktion in 3 Unterfraktionen aufgetrennt. Am Rotationsverdampfer wurden die Enkelfraktionen eingeeengt, anschließend tiefgefroren und mittels Lyophilisation vollständig getrocknet, wodurch die Subfraktionen L 1 – L 3 und H 1 – H 3 gewonnen werden.

6. Pharmakologischer Teil

6.1. Osteoprotektive Aktivität

Die Versuche zur osteoprotektiven Aktivität der *Cimicifuga*-Fraktionen wurden in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen untersucht. Es handelte sich dabei um ein Entwicklungsprojekt gefördert unter dem Aktenzeichen AZ-838-08 von der Bayerischen Forschungsförderung. Die osteoprotektive Aktivität wurde in der Arbeitsgruppe Endokrinologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. W. Wuttke analysiert. Der Testaufbau sowie die Messungen der Knochendichte wurden von Frau Dr. med. Lea Laß in ihrer Dissertation „Antiosteoporotische Prinzipien in *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/ C001 und ihren Fraktionen“ bereits ausführlich dargestellt [45]. Zur Vollständigkeit sollen der Versuchsaufbau und Messmethoden noch einmal zitiert werden.

6.1.1. *In vivo* Rattenmodell

Versuchstiere

Für die Tierversuche unter der Aufsicht von PD Dr. med. D. Seidlová-Wuttke wurden 40 Sprague-Dawley-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland) in acht Käfigen (Makrolon-Käfig Typ IV, Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpreisenberg) zu jeweils fünf Tieren gehalten. Die Tiere waren bei Ankunft im Labor etwa drei Monate alt. Die Haltung in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen fand unter Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig 33.11.42504-04-043/08 statt. Die Tiere waren bei konstanter Raumtemperatur von 23 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 50 % und 55 % sowie mit einem Tag-/ Nachtrhythmus von 12 h untergebracht. Wasser sowie entsprechendes Futter stand den Tieren zur freien Verfügung. Bei Versuchsbeginn hatten alle Ratten ein Gewicht zwischen 245 und 295 g. Um den Gewichtszuwachs bzw. Zuwachs an Gewebe pro Gramm Körpergewicht zu vergleichen, wurden die einzelnen Tiere so in Gruppen eingeteilt, dass jede Gruppe ein relativ ausgeglichenes Körpergewicht aufweist.

Messung der Knochenvolumenmineraldichte

Vor der Ovariectomie der Ratten sowie nach der Ovariectomie und anschließender vierwöchiger Applikation der getesteten Fraktionen wurden Knochenvolumenmineraldichtemessungen mit einem quantitativen Computertomographen (qCT) (Norland Stratec XCT Research SA+, Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim) an den Versuchstieren durchgeführt. Nach erfolgter Isoflurannarkose (Forene®, Abbott, Illionis, United States) wurden die Tiere gewogen und erhielten zur späteren Identifizierung einen Transponder (Transponder-UNO MICRO-ID-System mit ISO-Transponder, Uno-Roesvastaal BV, Zevenaar, Niederlande) subkutan in die Nackenregion implantiert. Die Zuordnung der jeweiligen Nummer erfolgte mit einem elektronischem Lesegerät (Gesreader II GeS008: ISO-kompatibler Taschenleser). Die Tiere wurden in eine spezielle Vorrichtung gelegt und das linke Bein mit einer Klemme fixiert, so dass sichergestellt werden konnte, dass die

EXPERIMENTELLER TEIL

Knochenmineraldichte eines jeden Tieres exakt an der gleichen Stelle der tibialen Metaphyse gemessen wurde.

Ovariectomie

Unter Isoflurannarkose (Forene®, Abbott, Illinois, United States) und postoperativer Analgesie (Rimadyl®, Pfizer, Berlin) wurden die Ratten im Anschluss an die erste qCT - Messung beidseitig ovariectomiert. Nach Entnahme der Ovarien wurde die Wunde genäht (Vicryl, Ethicon, Norderstedt) und mit Michel-Klammern verschlossen (Fa. Martin, Tuttlingen).

Applikation der Wirkstoffe

In der Eingewöhnungsphase erhielten die Tiere sojafreies Futter und wurden zwei Wochen vor Versuchsbeginn auf das sojafreie Kontrollfutter EF R/ M, E 150000-04 (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) umgestellt. Die zu testenden *Actaea racemosa* Fraktionen wurden als Zusatz in das Kontrollfutter gemischt und den Tieren ab Versuchsbeginn über 4 Wochen verabreicht.

Nachstehende Tabelle (Tab. 2) listet die Testsubstanz, die eingenommene Futtermenge, sowie die aufgenommene Substanzmenge auf:

Tab. 2 Übersicht über die eingenommene Futtermenge der Versuchstiere und die dadurch resultierende Substanzaufnahme im Durchschnitt pro Tier pro Tag

| Testsubstanz | Anzahl Tiere | Futteraufnahme [g/ Tier /Tag] | Substanzmenge [g/ Tier/ Tag] |
|---------------------|---------------------|--|---|
| Kontrolle | 10 | 17,95 | 0,0 |
| Östradiolbenzoat | 10 | 10,81 | $1,08 \times 10^{-4}$ |
| BNO 1055 | 10 | 16,45 | $8,22 \times 10^{-3}$ |
| Lipophile Fraktion | 10 | 17,17 | $2,019 \times 10^{-3}$ |
| Hydrophile Fraktion | 10 | 19,03 | $7,26 \times 10^{-3}$ |
| LF 1 | 10 | 18,37 | 0,01087 |
| LF 2 | 10 | 17,63 | 0,02029 |
| LF 3 | 10 | 19,56 | 0,02251 |
| HF 1 | 10 | 18,75 | 0,1295 |
| HF 2 | 10 | 18,71 | 0,02819 |
| HF 3 | 10 | 18,52 | 0,01331 |

6.1.2. Ermittelte Parameter

Die ermittelten Parameter sind die endostale Dichte (ED), definiert als die Dichte des Trabekelgeflechts innerhalb des endostealen Raumes (Spongiosa) in mg/cm^3 und die intraostale Fläche (IF), definiert als die Querschnittsfläche der endostealen, von Kortikalis umschlossener, Spongiosa in mm^2 .

Die kortikale Dichte (KD) ist die Dichte des Knochenmantels der die Spongiosa umgibt in mg/cm^3 .

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Querschnittsfläche des umgebenden Knochenmantels bezeichnet die kortikale Fläche (KF) angegeben in mm².

Aus dem gewonnenen Blut der Versuchstiere wurden bestimmte Serumparameter bestimmt, insbesondere die Konzentration von Osteokalzin und von CrossLaps. Diese Parameter wurden mit standardisierten Radioimmunfluoreszenzassays ermittelt.

Das Versuchsdesign des in vivo Rattenmodell gibt Abb. 8 wieder.

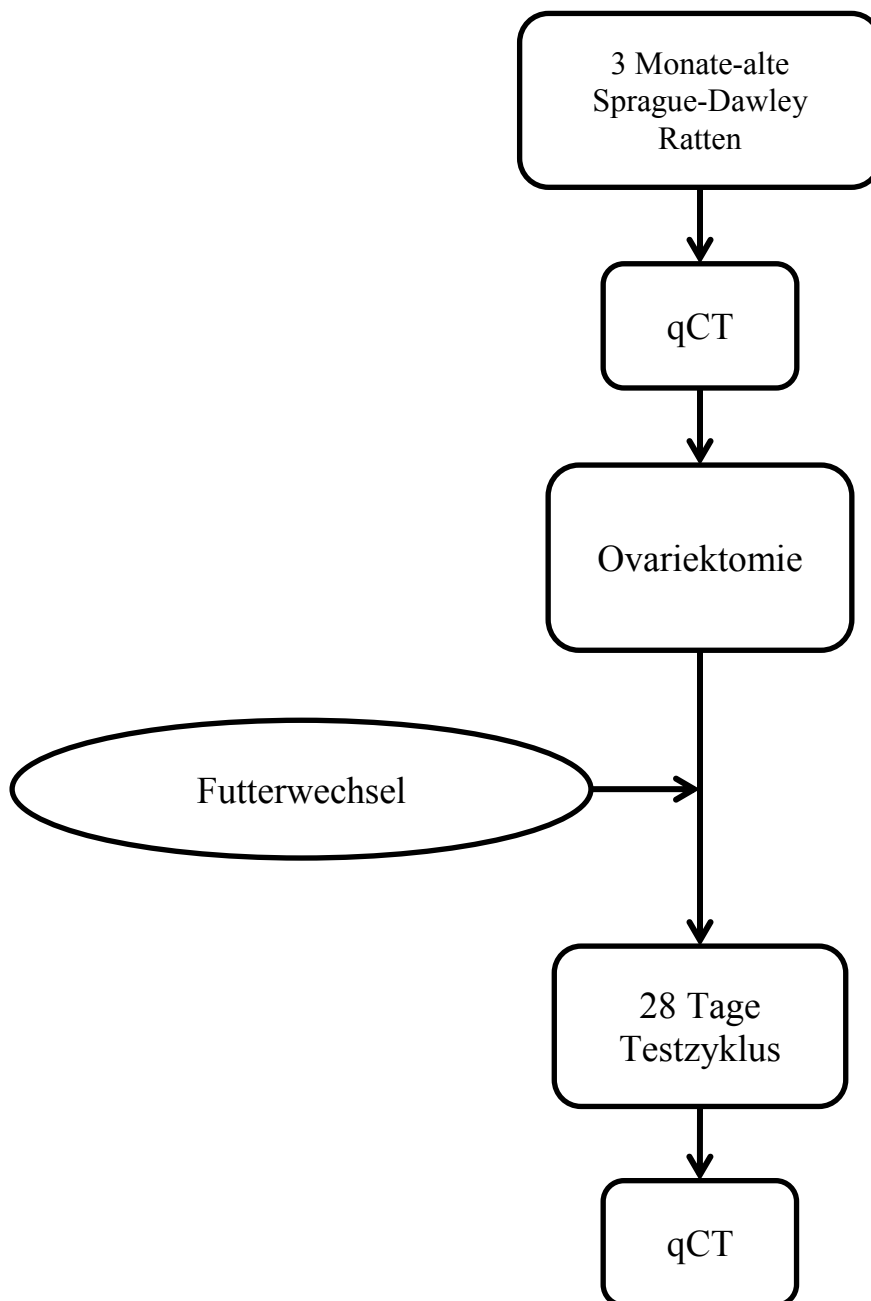


Abb. 8 Versuchsaufbau des in vivo Rattenmodell

6.2. Permeabilitätsstudie am Caco-2 Modell

Die Caco-2 Zelllinie (humane Kolonkarzinomzellen) wurde erstmals 1977 von Fogh isoliert [46] und in den 90er Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen für Permeabilitätsuntersuchungen weiterentwickelt [47-49]. Das Caco-2 Modell gehört zu den etabliertesten und am meisten genutzten Systemen zur Untersuchung von Permeabilitätseigenschaften [47, 50-53]. Nach Kultivierung der Zellen auf geeigneten Transportplatten bildet sich spontan eine konfluente „Monolayer“, die eine Polarisierung in einen apikalen Bürstensaum aufweist und mit der entsprechenden Enzymausstattung, wie z.B. Hydrolasen, Phosphatasen [54], die Eigenschaften intestinaler absorptiver Enterozyten übernimmt. Enzyme des präsystemischen Metabolismus, z.B. Peptidasen (8 von 10 der in der humanen Bürstensaummembran vorkommenden Peptidasen), werden ebenfalls exprimiert [55, 56]. Das Caco-2 Zellmodell mit seinen Eigenschaften nimmt eine Zwischenstellung zwischen rein physikalisch-chemischen Tests und klinischen Studien am Menschen ein.

Die Untersuchungen werden auf Transportplatten (z.B. Transwell®-System) durchgeführt, in denen eine Polycarbonatmembran ein apikales (Donor) von einem basolateralen (Receiver) Kompartiment abtrennt (Abb. 9) [57]. Auf diese Membran werden die vereinzelt Caco-2 Zellen in bestimmter Menge ausgesät und wachsen über einen Zeitraum von 21 - 28 Tagen zu einer zusammenhängenden Schicht aus.

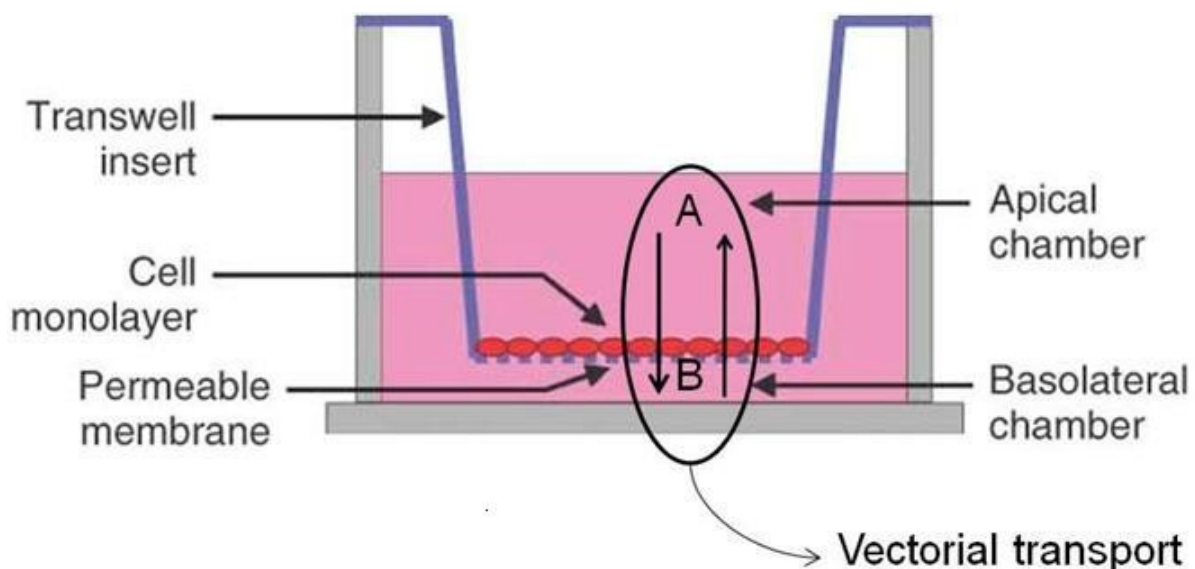


Abb. 9 Schematischer Aufbau des Caco-2 Zellmodells [57]

EXPERIMENTELLER TEIL

Zur Analyse der Absorptionseigenschaften werden die zu untersuchenden Substanzen apikal aufgegeben und über einen bestimmten Zeitraum der Anteil an Substanz, der auf die basolaterale Seite permeieren konnte, gemessen ($A \rightarrow B$, Absorptionsrichtung). Um die Sekretion (Efflux) einer Substanz zu bestimmen, erfolgen die Transporte in umgekehrter Weise, indem die Substanz auf die basolaterale Seite gegeben und die Konzentration apikal bestimmt wird ($B \rightarrow A$, Sekretionsrichtung). Über die Berechnung des Papp-Wertes oder über den Anteil an absolut permeierter Substanz erhält man eine Aussage zur Permeabilität.

Im Rahmen des BCS-Systems (Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem) wird das Caco-2 Modell dazu genutzt, die Wirkstoffe nach ihrer Löslichkeit und Permeabilität zu klassifizieren [58]. Wenn ein Präparat der Klasse I zugeordnet wird, d.h. hohe Löslichkeit und hohe Permeabilität besitzt, kann im Rahmen von Bioäquivalenztests zweier wirkstoffgleicher Präparate auf in vivo Bioverfügbarkeitsstudien verzichtet werden [59]. Dadurch kann es zu erheblichen Kostenersparnissen kommen, da sich eine typische Bioäquivalenzprüfung, angefangen bei der Herstellung bis hin zur bioanalytischen Auswertung, auf gut 250.000 € belaufen kann [60].

6.2.1. Material

Die beiden Trockenextrakte C001 und C005 werden für die Permeabilitätsstudie verwendet (s. Kapitel B. 1.3).

Standards und Reagenzien:

Propranololhydrochlorid wurde von Fagron GmbH & Co KG (Barsbüttel, Deutschland) bezogen. HEPES wurde von VWR (Darmstadt, Deutschland), Fluorescein Na wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), „Hank`s Balanced Salt Solution“ und Trypanblau wurde von Biochrom, Berlin erworben. Phares SIF™ Powder wurde von der Phares AG (MuttENZ, Schweiz) erworben.

Lösungsmittel:

Alle Lösungsmittel für die Chromatographie werden in Kapitel B. 2.2 bereits detailliert aufgeführt.

EXPERIMENTELLER TEIL

6.2.2. Herstellung der *Actaea racemosa* BNO 1055 - Stammlösung

In einen 100 ml Messkolben wurden 20 mg BNO 1055 Spezialextrakt C001 und C005 eingewogen und mit simulierter Intestinalflüssigkeit, modifizierter FaSSIF (Fasted State Simulated Intestinal Fluid), 30 min im Ultraschallbad gelöst. Die Konzentration an 27-Deoxyactein in dieser Stammlösung wurde mittels der HPLC-Methode 06 bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen der T0-Werte sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3 27-Deoxyactein Konzentration in den FaSSIF Stammlösungen der beiden BNO 1055 Spezialextrakte C001 und C005 in µg/L

| C001 | C005 |
|----------|----------|
| 1860,071 | 1538,677 |

6.2.3. Herstellung des modifizierten FaSSIF für die Caco-2 Transportversuche

Phares SIF™ Pulver, ein Kombinationsprodukt aus Na-Taurocholat und Lecithin (in einem 4:1 molaren Verhältnis) wurde zur Herstellung des Transportmediums genutzt. Dazu wurden die notwendigen 0,56 g Phares SIF® Pulver direkt in 250 ml HBSS („Hank`s Buffered Salt Solution“) gelöst mit Zusatz von 10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) eingestellt auf pH 6,5.

Die Lösungen wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert und innerhalb von 48 Stunden verwendet. Die Dauer von 2 Stunden ist notwendig, um besonders im Fall von FaSSIF eine vollständige Mizellbildung zu gewährleisten. Der Transportpuffer zeigt danach ein leicht opaleszentes Erscheinungsbild. Das FaSSIF Medium enthält 3 mM Na-Taurocholat und 0,75 mM Phosphatidylcholin in HBSS. Die Zusammensetzung der physiologischen Transportlösung HBSS ist in Tab. 4 aufgeführt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Tab. 4 Zusammensetzung der physiologischen Transportlösung HBSS („Hanks´ Balanced Salt Solution“) in mg/ L (Produktinformation Biochrom)

| | |
|--------------------------------------|------|
| NaCl | 8000 |
| KCl | 400 |
| Na ₂ HPO ₄ | 48 |
| KH ₂ PO ₄ | 60 |
| MgSO ₄ *7H ₂ O | 200 |
| CaCl ₂ | 140 |
| Glukose | 1000 |
| NaHCO ₃ | 350 |

6.2.4. Durchführung von Löslichkeitsversuchen

Vor den eigentlichen Transportversuchen wurde die Löslichkeit von 27-Deoxyactein in modifizierten FaSSIF untersucht. Dafür wurden die beiden Trockenextrakte C001 und C005 in Konzentrationen von 2 g/L bis 100 g/L mit Transportmedium gelöst und für 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Als Vergleich diente die gleiche Aufarbeitung mit Ethanol 50 % (m/m). Anschließend wurden die Lösungen bzw. Suspensionen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 3000 U/ min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der HPLC-Methode 06 analysiert und die Konzentration an 27-Deoxyactein miteinander verglichen.

6.2.5. Kultivierung des Caco-2 Zellmodells

Die Kultivierung der Caco-2 Zellen (bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC, Maryland, USA)) erfolgte nach Aussäen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen in 75 cm² Flaschen (Corning®, Wiesbaden). Anschließend wurden die Zellen über 3 Wochen in Kulturmedium, bestehend aus DMEM („Dulbecco´s modified Eagle´s medium“, + 25 mM Glukose), 10 % FCS (fötales Kälberserum), 1 % NEAA (nicht essentielle Aminosäuren) und 0,1 mg/ ml Gentamycin kultiviert. Die entsprechenden Medien wurden von der Biochrom AG, Berlin (Deutschland) bezogen. Die Inkubation erfolgte bei einer relativen Feuchtigkeit von 90 %, einem CO₂-Gehalt von 10 % und einer Temperatur von 37 °C.

Der Medienwechsel erfolgte jeden zweiten beziehungsweise dritten Tag. Nach sieben Tagen wurden die Zellen trypsiniert, um ein vorzeitiges Ausdifferenzieren zu verhindern. Dabei wurde der Zellboden der Kultivierungsflasche zunächst zweimal mit je 5 ml PBS („Phosphate

EXPERIMENTELLER TEIL

Buffered Saline“, Biochrom AG Berlin, Deutschland) gewaschen und anschließend für 15 min mit 5 ml Trypsin inkubiert (37 °C, 90 % relative Feuchte, 10 % CO₂). Nach leichtem Abklopfen der noch nicht vollständig abgelösten Zellen wurde die Suspension zweimal mit 15 ml Kulturmedium versetzt und nach Überführen in ein 50 ml Falcon Röhrchen für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das verbliebene Zellagglomerat in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Aus der homogenisierten Zellsuspension wurden 200 µl entnommen, mit 200 µl Trypanblau versetzt und kräftig geschüttelt. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und $6,5 \times 10^4$ Zellen/cm² auf 12 Well Transwell® Platten ausgesät (1,2 cm² Polycarbonatmembran, 0,4 µm Porengröße, Donor Volumen 0,5 ml, Receiver Volumen 1,5 ml, Corning, NY, USA, s. Abb. 10).

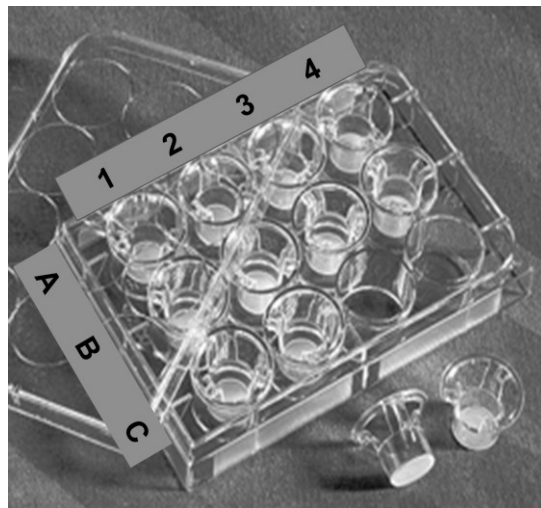


Abb. 10 Transwell® Polycarbonat Filtersystem. Die Beschriftung setzt sich aus dem Buchstaben für die Insertreihen und der Nummerierung der individuellen Inserts 1-4 zusammen.

Die Zellen wurden dann über drei Wochen bis zur vollständigen Ausdifferenzierung und Bildung eines konfluenten Monolayers kultiviert. Die vollständige Bildung des Monolayers wurde mit Hilfe eines Mikroskops dokumentiert. Die Abb. 11, Abb. 12 und Abb. 13 zeigen das Wachstum sowie die Ausbildung der Monolayerschicht am Tag 3, Tag 19 und Tag 27 an der die Zellschicht vollständig ausgebildet vorliegt. Die Transporte werden am Tag 21 - 28 nach dem Aussäen durchgeführt. Am Tag vor den Transporten wird ein Medienwechsel durchgeführt.

EXPERIMENTELLER TEIL

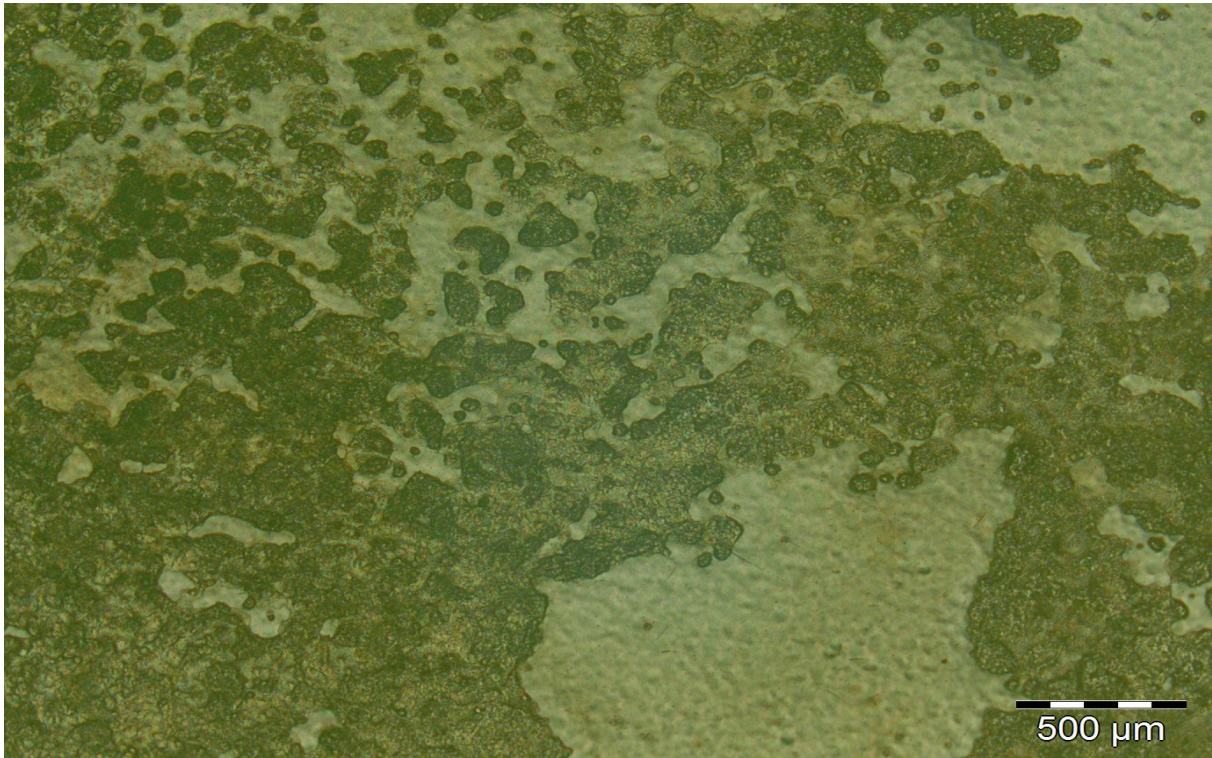


Abb. 11 Zellwachstum an Tag 3

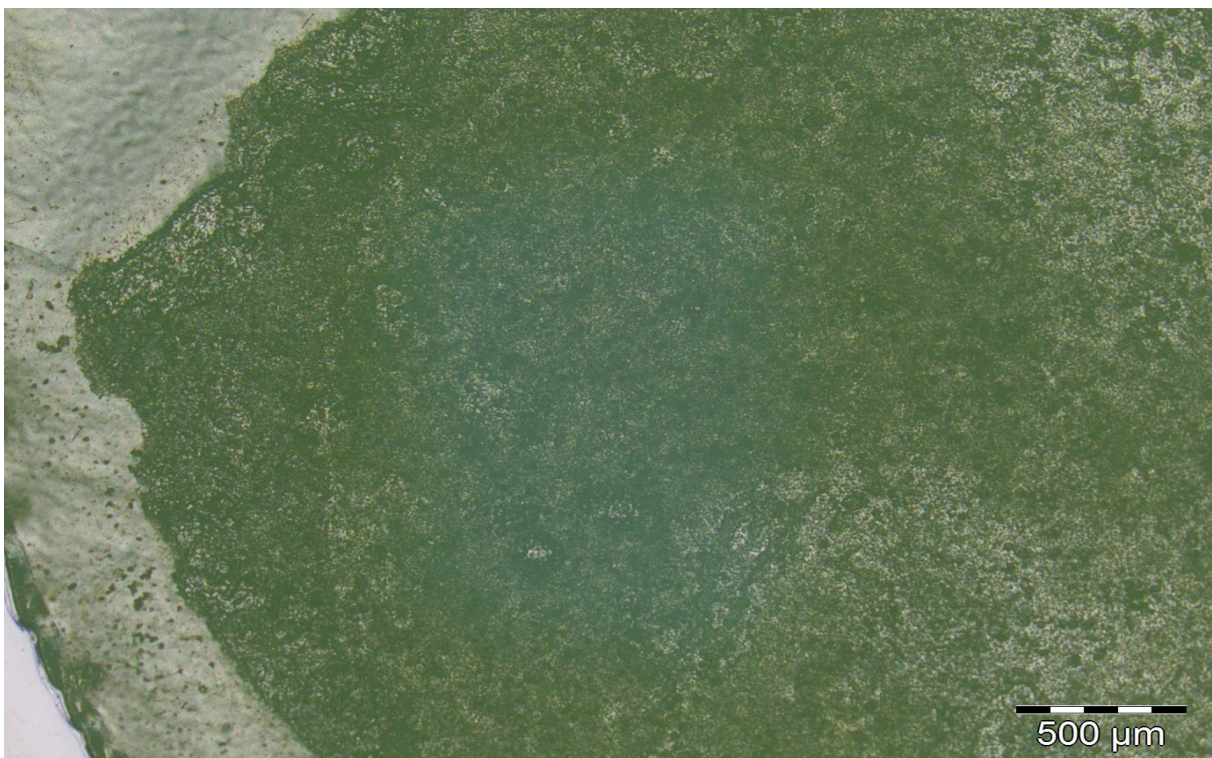


Abb. 12 Zellwachstum an Tag 19

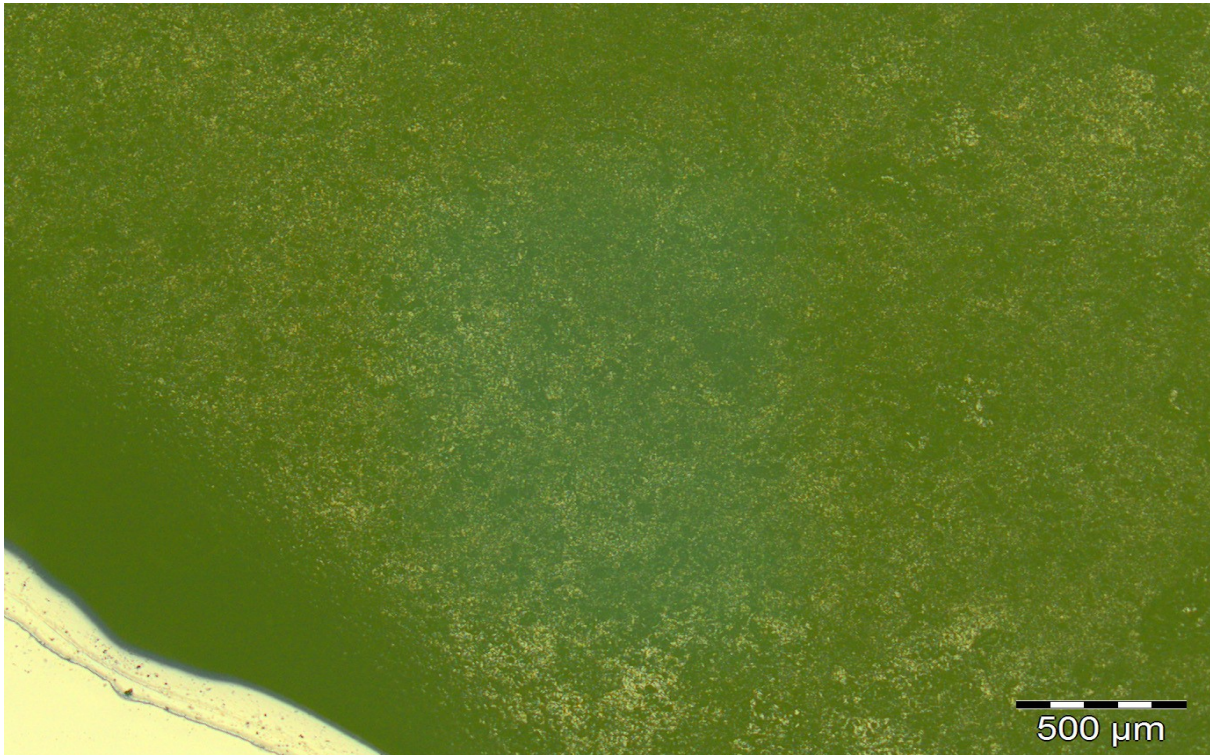


Abb. 13 Fertig ausgebildete Monolayerschicht der Caco-2 Zelllinie am Tag 27

6.2.6. Durchführung der Caco-2 Transporte

Die Transportversuche erfolgten in absorptiver Richtung (von apikal nach basolateral, A → B). Vor der Applikation der zu untersuchenden Transportlösung wurden die Zellen zweimal mit HBSS Puffer (+ 10 mM HEPES, pH 7,4 → Transportpuffer) gewaschen und anschließend in diesem Puffer für 15 min auf einem temperierbaren Horizontalschüttler (Thermoschüttler SH26, CAT Zipperer, Staufen, 37 °C, 120 UpM) inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung des TEER-Wertes (transepithelialer elektrischer Widerstand) direkt vor den Transporten mittels Chopstick Elektrode (Millicell-ERS Widerstandsmessgerät, Millipore, Eschborn). Die Transportversuche wurden nur dann fortgeführt, wenn folgende Spezifikation erfüllt war:

$$\text{TEER-Werte} > 250 \Omega \cdot \text{cm}^2 \text{ [61, 62]}$$

Bei Erfüllung der Spezifikation wurde der HBSS durch die Transportlösung ersetzt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Transporte A → B

Unmittelbar nach apikaler Applikation der Transportlösung wurde ein Aliquot der Probenlösung zur Bestimmung der Anfangskonzentration (T₀) entnommen.

Zu den festgelegten Zeitpunkten von 30, 60, 90, 120, 180, 240 und 300 min wurde jeweils das ganze basolaterale Medium (1,5 ml) entnommen und durch frischen Transportpuffer ersetzt. Die Inserts werden dabei in ein mit frisch basolateralem Medium gefülltes Akzeptor-Kompartiment umgesetzt. Das Donor-Kompartiment, ca. 300 µl, wird am Ende der Transportversuche entnommen.

Transporte B → A

Aus den Akzeptor-Kompartimenten wurde zu den festgelegten Zeitpunkten ca. 300 µl Aliquot entnommen und mit frischem Transportpuffer aufgefüllt. Hier muss sehr sorgfältig vorgegangen werden, um die Monolayer-Zellschicht nicht zu beschädigen. Die Probenlösung im Donor-Kompartiment (basolateral) wurde am Ende der Versuche vollständig entnommen. Aus der verbliebenen Lösung des Donor-Kompartiments wurde nach dem Transport ebenfalls ein 100 µl Aliquot entnommen und zur Analyse verwendet.

Im Anschluss an die Transporte wurde, nach einmaligem Waschen der Zellen mit HBSS-Puffer, erneut der TEER-Wert gemessen. Die Auswertung der Transportversuche kann ausgewertet werden, wenn ein TEER-Wert $> 250 \Omega \cdot \text{cm}^2$ gemessen wurde.

6.2.7. Aufarbeitung der Permeabilitätsproben zur HPLC Analyse

Zur Bestimmung der Anfangskonzentration wurden 100 µl der Probenlösung mit 800 µl Methanol 40 % (v/v) und 100 µl interner Standard Galphimin B (Endkonzentration 500 µg/L) verdünnt und direkt mittels HPLC-Methode 06 analysiert.

Transporte A → B

Von den entnommenen basolateralen Proben wurde je ein Aliquot von 500 µl mit 400 µl Methanol 40 % (v/v) mit 100 µl interner Standard Galphimin B (Endkonzentration 500 µg/L) verdünnt und analysiert. Von den apikalen Proben wurden jeweils 100 µl Probe mit 800 µl Methanol 40 % (v/v) und 100 µl IS verdünnt und untersucht.

Transporte B → A

Durch das geringe vorhandene Volumen der Akzeptor-Proben wurden je 200 µl mit 160 µl Methanol 40 % (v/v) und 40 µl interner Standard Galphimin B aufarbeitet. Von den Donor-Lösungen wurden je 500 µl verwendet und 400 µl Methanol 40 % (v/v) mit 100 µl interner Standard zu pipettiert.

Alle Transportproben wurden lediglich verdünnt, eine weitere Aufarbeitung war nicht notwendig, und mit der HPLC-Methode 06 auf den Gehalt an 27-Deoxyactein untersucht.

6.2.8. Auswertung der Transportversuche

Die ausreichende Permeabilität beziehungsweise Integrität der Zellpassage wurde anhand von simultanen Transportversuchen mit Propranolol-Hydrochlorid (als Positiv-Kontrolle, transzellulärer Marker) und Fluorescein-Na (Negativ-Kontrolle, parazellulärer Marker) sichergestellt. Zusätzlich wurde der TEER-Wert (transepithelialer elektrischer Widerstand) direkt vor, beziehungsweise nach den Transporten mittels Chopstick Elektrode bestimmt (Millicell-ERS Widerstandsmessgerät, Millipore, Eschborn). Die Transportversuche wurden nur dann ausgewertet, wenn folgende Spezifikationen erfüllt waren:

Papp-Werte:

- Propranolol HCl $> 10 \times 10^{-6}$ [cm/s]
- Fluorescein Na $< 1 \times 10^{-6}$ [cm/s]

Als Positiv-Kontrolle wurde ein Transport über 50 min mit 10 minütiger Probenahmen mit Propranolol durchgeführt. Die Negativ-Kontrolle wurde mit FITC-Dextran anhand einer Probennahme zum Zeitpunkt 70 min erfolgreich mitgeführt.

Die Versuche wurden vom Zentrallabor Deutscher Apotheker durchgeführt und die Ergebnisse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Massenbilanz/Wiederfindung

Nach dem Transport wiedergefundener Anteil der initialen Konzentration t_0

EXPERIMENTELLER TEIL

Formel Papp-Wert

$$P_{app} = \frac{dc}{dt} \times \frac{V}{(A \times t_0)} \left[\frac{\text{cm}}{\text{s}} \right]$$

- dc/dt = Substanzfluss durch den Monolayer $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml} \times \text{s}} \right]$
 V = Receiver Volumen (ml)
 t_0 = Ausgangskonzentration Donorkompartiment $[\mu\text{g}/\text{ml}]$
 A = Oberfläche der Zellmonolayer $[\text{cm}^2]$

Formel Efflux Ratio

$$\text{Efflux Ratio} = \frac{P_{app} (BA)}{P_{app} (AB)}$$

Aus dem ermittelten Wert lässt sich wie folgt der Transportmechanismus ableiten:

| Transport Mechanismus | Efflux Ratio |
|-----------------------|--------------|
| Absorption (aktiv) | $\ll 1$ |
| Diffusion (passiv) | ~ 1 |
| Sekretion (aktiv) | $\gg 1$ |

Formel TEER-Wert

$$Teer = R_c + f - R_f \times A \left[\Omega \times \text{cm}^2 \right]$$

- R_c+f = Widerstand der Zellschicht plus Filter
 R_f = Widerstand des Filters
 A = Oberfläche der Zellschicht (cm^2)

Formel Berechnung der Wiederfindung

$$\text{Wiederfindung} = 100 \times \frac{C_{apikal} + C_{basolateral}}{t_0} \quad [\%]$$

- C_{apikal} = apikale Konzentration nach den Transporten
 $C_{basolateral}$ = basolaterale Konzentration nach den Transporten
 t_0 = Anfangskonzentration

6.3. 5-HT 7 Rezeptorbindungsstudie

6.3.1. Testsystem

Die Wirkung von *A. racemosa* an dem Serotonin Rezeptor 5-HT 7 wurde bei der Firma CEREP (Celle, Frankreich) untersucht. Es handelt sich bei dem Assay um einen Ligandenbindungsassay an einer menschenähnlichen rekombinanten Ovarialzelllinie des chinesischen Hamsters (CHO-cells, „chinese hamster ovary“). Gemessen wurde der agonistische Effekt der Drogenchargen (siehe Kapitel B. 1.1.) von *A. racemosa* sowie die beiden Trockenextrakt Chargen C001 und C005. Der Effekt wird anhand der Produktion von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) mit Hilfe der HTRF-Methode (homogenous time resolved fluorescence) gemessen und beurteilt [63]. Durch die Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors durch einen Neurotransmitter wird die membranständige Adenylatcyclase stimuliert, welche zelluläres Adenosintriphosphat (ATP) in cAMP umwandelt. Als Kontrollsubstanz wurde Serotonin mit einer Konzentration von $4.0 \cdot 10^{-8}$ eingesetzt. Die Ergebnisse der Extraktlösungen werden in Prozent angegeben, bezogen auf die Kontrollsubstanz:

$$\frac{\text{measured response}}{\text{control response}} * 100$$

Die EC_{50} wurde mittels nicht-linearer Regressionsanalyse der Mittelwerte dreier Replikate der Konzentrationswirkungskurve folgendermaßen berechnet:

$$Y = D + \left[\frac{A - D}{1 + \frac{C}{C_{50}}^{nH}} \right]$$

Y = Wirkung

A = linke Asymptote

D = rechte Asymptote

C = Konzentration Probe

$C_{50} = EC_{50}$

nH = slope Faktor

Die Berechnung erfolgte mit der kommerziell erhältlichen Software Prism 5 für Windows, Graphpad Software.

Der Ligandenbindungsassay basiert auf der Forschungsarbeit von Adham N. et al. [63].

6.3.2. Herstellung der Prüflösungen

Mittels einer Mörsermühle wurden die Drogenchargen grob zerkleinert und anschließend durch eine Zentrifugalmühle auf eine Korngröße von 500 µm vermahlen. Die vermahlenden Drogen werden in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und anschließend mit 10 ml Ethanol 50 % (m/m) 30 min bei 40 °C im Ultraschallbad extrahiert. Die Endkonzentration der Extraktlösungen beträgt 100 g/ L. Anschließend werden die Extrakte 5 min bei 3000 U/ min zentrifugiert.

Die Einwaage der beiden Trockenextraktchargen wird über das Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV) berechnet, um den Wirkungseffekt mit den extrahierten Drogen zu vergleichen. Das DEV beträgt 5 - 10: 1.

Als negativ Kontrolle wurde eine Probe 10 ml Ethanol 50 % (m/m) auf dieselbe Weise wie die Prüflösungen aufarbeitet und gemessen.

Als Reinsubstanz und eventueller aktiver Wirkstoff in *A. racemosa* wurde Nω-Methylserotonin ebenfalls aufgearbeitet und analysiert. Die Quantifizierung von Nω-Methylserotonin in C001 und C005 ergab einen Gehalt zwischen 5,4 µg bzw. 6,3 µg pro 100 mg TE. Nω-Methylserotonin wurde, um die Aktivität der Substanz in diesem Konzentrationsbereich zu bestätigen, auf den durchschnittlichen Gehalt in den Proben der Trockenextrakte C001 und C005 eingewogen und aufgearbeitet. Dabei ergab sich ein Gehalt von 0,9875 µg/ml für Nω-Methylserotonin.

Die Prüflösungen wurden in Braunglasvials zu je 1,5 ml, dicht verschlossen und kühl, per Expresskurier zu CEREP geliefert. Um die zytotoxischen Eigenschaften von Ethanol in dem Testsystem zu unterbinden, wurden die Proben jeweils 1: 100 verdünnt eingesetzt.

C. Ergebnisse

1. Extraktionsverfahren *Actaea racemosa rhizoma*

Mit dem Vergleich der Extraktionsmittel sollte die Frage geklärt werden, ob und in wie weit es Unterschiede im Inhaltsstoffprofil bei *Actaea racemosa* gibt, wenn mit Ethanol oder 2-Propanol extrahiert wird und welche Aufarbeitung in Bezug auf das Inhaltsstoffprofil von *A. racemosa* am besten geeignet ist.

Es wurden 3 Drogenchargen untersucht (Kapitel B.1.2). Die Drogen wurden sowohl geschnitten als auch gepulvert auf Unterschiede im Inhaltsstoffprofil nach Extraktion untersucht.

1.1. Extraktionsmittel Ethanol 58 % (v/v)

1.1.1. Identitätsprüfung der Saponine mittels TLC

Die TLC Analysen wurden mittels der TLC Methode 01 durchgeführt. Der DC-Fingerprint aller 3 Drogenchargen (Abb. 14, Abb. 15, Abb. 16), die mit Ethanol 58 % (V/V) extrahiert worden waren, zeigt untereinander ein vergleichbares Muster. Auffällig sind etwas schwächere Banden bei der forcierten Extraktion der geschnittenen Droge unter Rückfluss bei 90 °C. Unter diesen Bedingungen werden bei einer geschnittenen Ausgangsdroge die Inhaltsstoffe offensichtlich nicht komplett extrahiert.

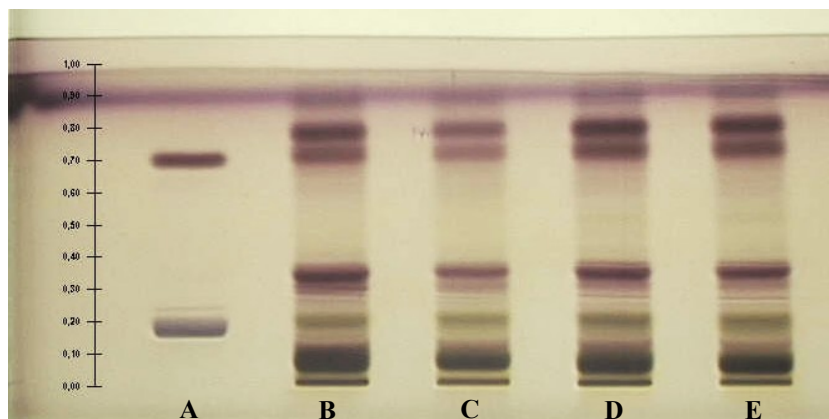


Abb. 14 TLC auf Saponine, Charge 0000027838, Extraktionsmittel Ethanol 58 % (V/V), Aufgetragen als 15 mm breite Banden, Referenzlösung Aescin $R_f = 0.18$ und 27-Deoxyactein $R_f = 0.7$ (A), pulverisierte Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (B), geschnittene Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (C), pulverisierte Droge 24 h Bewegungsmazeration (D), geschnittene Droge 24 h Bewegungsmazeration (E)

ERGEBNISSE

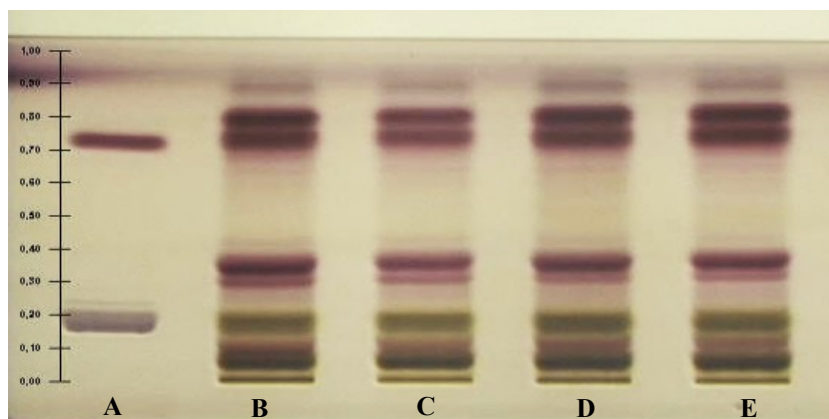


Abb. 15 TLC auf Saponine, Charge 0000026867, Extraktionsmittel Ethanol 58 % (V/V), Aufgetragen als 15 mm breite Banden, Referenzlösung Aescin $R_f = 0.18$ und 27-Deoxyactein $R_f = 0.7$ (A), pulverisierte Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (B), geschnittene Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (C), pulverisierte Droge 24 h Bewegungsmazeration (D), geschnittene Droge 24 h Bewegungsmazeration (E)

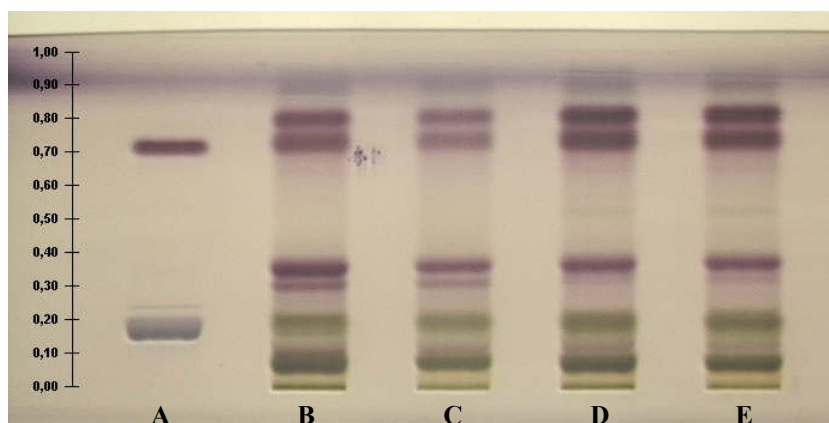


Abb. 16 TLC auf Saponine, Charge 0000026766, Extraktionsmittel Ethanol 58 % (V/V), Aufgetragen als 15 mm breite Banden, Referenzlösung Aescin $R_f = 0.18$ und 27-Deoxyactein $R_f = 0.7$ (A), pulverisierte Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (B), geschnittene Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (C), pulverisierte Droge 24 h Bewegungsmazeration (D), geschnittene Droge 24 h Bewegungsmazeration (E)

1.1.2. Gehaltsbestimmung von Isoferulasäure

Die Gehaltsbestimmung wird mit der HPLC-Methode 01 durchgeführt, als Standard wird dabei Isoferulasäure verwendet.

Die Gehalte des quantifizierten Markers Isoferulasäure variieren zwischen der gepulverten und der geschnittenen Droge (Tab. 5). Die Charge 0000026766 zeigte insgesamt eine geringere quantitative Zusammensetzung der Phenylpropanoide. In Abb. 20 ist exemplarisch ein Chromatogramm der HPLC-Analyse zur Gehaltsbestimmung der Isoferulasäure gezeigt.

ERGEBNISSE

Tab. 5 Gehalt an Isoferulasäure in gepulverter und geschnittener Droge in ethanolischer Lösung. Gegenüberstellung der beiden Extraktionsverfahren, 30 min bei 90 °C und 24 h Bewegungsmazeration bei RT

| | Ch.: 0000027838 | | Ch.: 0000026867 | | Ch.: 0000026766 | |
|---|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| | 30 min | 24 h | 30 min | 24 h | 30 min | 24 h |
| Gehalt Isoferulasäure [mg/ 100mg pulv Droge] | 0,07 | 0,07 | 0,08 | 0,06 | 0,08 | 0,07 |
| Gehalt Isoferulasäure [mg/ 100mg conc Droge] | 0,06 | 0,07 | 0,07 | 0,06 | 0,06 | 0,06 |

1.1.3. Gehaltsbestimmung der Triterpenglycoside

Die Gehaltsbestimmung der Triterpenglycoside wird mit der HPLC-Methode 03 durchgeführt, als Referenzstandard dient hierbei Monoammoniumglycerrhizat, worüber die Gesamtheit der Saponine quantifiziert wird.

Der Gesamtgehalt an Triterpenglycosiden variiert in Bezug auf den Zerkleinerungsgrad des Ausgangsmaterials bei der forcierten Extraktion bei 90 °C unter Rückfluss (Tab. 6). Hier liegt der Gesamtgehalt an Saponinen bei der geschnittenen Droge deutlich geringer als bei dem gepulvertem Ausgangsmaterial. Dieser Einfluss ist bei der schonenden Extraktion bei Raumtemperatur für 24 h nicht gegeben. Abb. 21 zeigt ein Beispielchromatogramm der Analyse mittels HPLC-ELSD.

Tab. 6 Gehalt an Saponinen in gepulverter und geschnittener Droge in ethanolischer Lösung. Gegenüberstellung der beiden Extraktionsverfahren, 30 min bei 90 °C und 24 h Bewegungsmazeration bei RT

| | Ch.: 0000027838 | | Ch.: 0000026867 | | Ch.: 0000026766 | |
|---|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| | 30 min | 24 h | 30 min | 24 h | 30 min | 24 h |
| Gehalt Saponine [mg/ 100mg pulv Droge] | 4,46 | 4,51 | 5,43 | 5,30 | 3,95 | 4,06 |
| Gehalt Saponine [mg/ 100mg conc Droge] | 2,34 | 3,67 | 3,64 | 4,84 | 2,05 | 3,25 |

1.2. Extraktionsmittel 2-Propanol 40 % (v/v)

1.2.1. Identitätsprüfung der Saponine mittels TLC

Dieselben 3 Drogenchargen wurden nun mit 2-Propanol 40 % (V/V) extrahiert und mit den ethanolisch extrahierten Chargen anhand ihres DC-Fingerprints untereinander verglichen (TLC-Methode 01). Der DC-Fingerprint aller 3 Drogenchargen, die mit 2-Propanol 40 % (V/V) extrahiert worden waren, zeigt bei allen Chargen ein vergleichbares

ERGEBNISSE

Muster (Abb. 17, Abb. 18, Abb. 19). Auffällig, wie auch im Extraktionsversuch mit Ethanol 58 % (V/V), sind etwas schwächere Banden bei der forcierten Extraktion der geschnittenen Droge unter Rückfluss bei 90 °C.

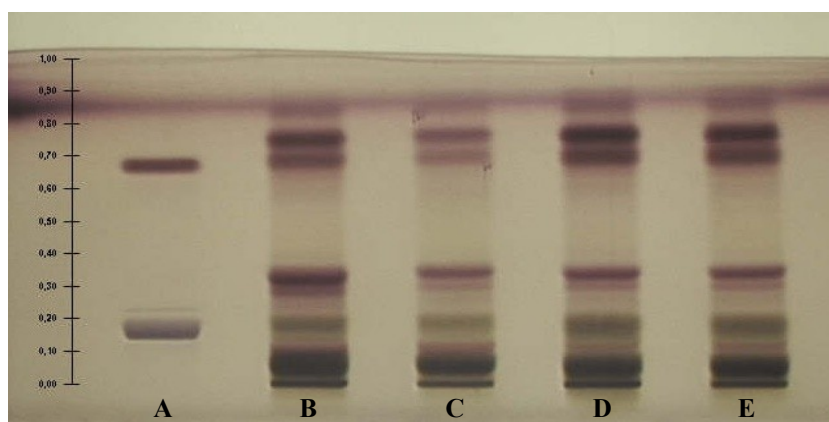


Abb. 17 TLC auf Saponine, Charge 0000027838, Extraktionsmittel 2-Propanol 40 % (V/V), Aufgetragen als 15 mm breite Banden, Referenzlösung Aescin $R_f = 0.18$ und 27-Deoxyactein $R_f = 0.7$ (A), pulverisierte Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (B), geschnittene Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (C), pulverisierte Droge 24 h Bewegungsmazeration (D), geschnittene Droge 24 h Bewegungsmazeration (E)

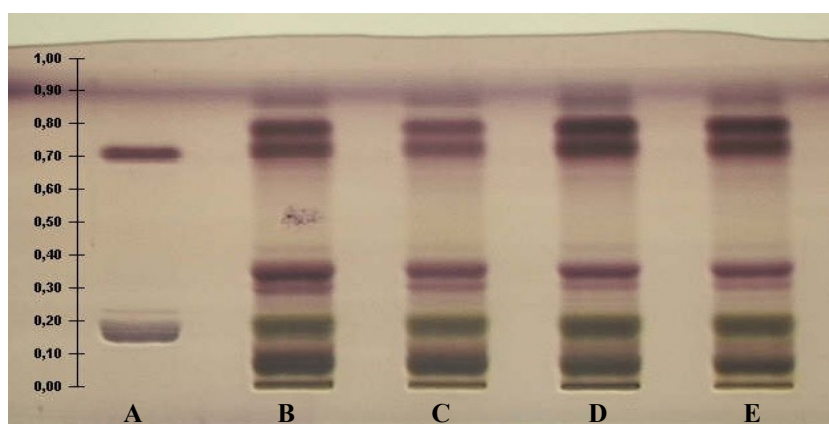


Abb. 18 TLC auf Saponine, Charge 0000026867, Extraktionsmittel 2-Propanol 40 % (V/V), Aufgetragen als 15 mm breite Banden, Referenzlösung Aescin $R_f = 0.18$ und 27-Deoxyactein $R_f = 0.7$ (A), pulverisierte Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (B), geschnittene Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (C), pulverisierte Droge 24 h Bewegungsmazeration (D), geschnittene Droge 24 h Bewegungsmazeration (E)

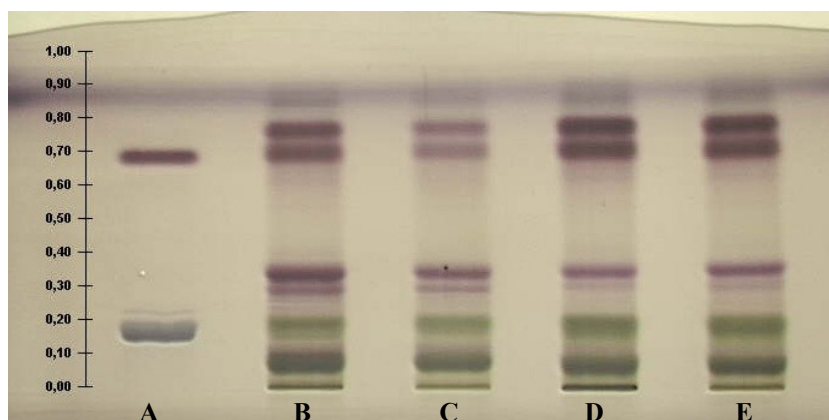


Abb. 19 TLC auf Saponine, Charge 0000026766, Extraktionsmittel 2-Propanol 40 % (V/V), Aufgetragen als 15 mm breite Banden, Referenzlösung Aescin $R_f = 0.18$ und 27-Deoxyactein $R_f = 0.7$ (A), pulverisierte Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (B), geschnittene Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (C), pulverisierte Droge 24 h Bewegungsmazeration (D), geschnittene Droge 24 h Bewegungsmazeration (E)

ERGEBNISSE

1.2.2. Gehaltsbestimmung von Isoferulasäure

Die Gehalte des quantifizierten Markers Isoferulasäure variieren zwischen der gepulverten und der geschnittenen Droge (Tab. 7). Die Charge 0000026766 zeigt auch bei der Extraktion mit 2-Propanol eine geringere quantitative Zusammensetzung der Hydroxyzimtsäurederivate.

Tab. 7 Gehalt an Isoferulasäure in gepulverter und geschnittener Droge in isopropanolischer Lösung. Gegenüberstellung der beiden Extraktionsverfahren, 30 min bei 90 °C und 24 h Bewegungsmazeration bei RT

| | Ch.: 0000027838 | | Ch.: 0000026867 | | Ch.: 0000026766 | |
|---|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| | 30 min | 24 h | 30 min | 24 h | 30 min | 24 h |
| Gehalt Isoferulasäure [mg/ 100mg pulv Droge] | 0,08 | 0,08 | 0,08 | 0,07 | 0,08 | 0,09 |
| Gehalt Isoferulasäure [mg/ 100mg conc Droge] | 0,06 | 0,07 | 0,07 | 0,06 | 0,06 | 0,08 |

1.2.3. Gehaltsbestimmung der Triterpenglycoside

Vergleichbar mit der Gehaltsbestimmung der ethanolischen Proben, variiert der Gesamtgehalt an Triterpenglycosiden in Bezug auf den Zerkleinerungsgrad des Ausgangsmaterials. Dieser Einfluss ist bei der schonenden Extraktion bei Raumtemperatur für 24 h nicht gegeben.

Tab. 8 Gehalt an Saponinen in gepulverter und geschnittener Droge in isopropanolischer Lösung. Gegenüberstellung der beiden Extraktionsverfahren, 30 min bei 90 °C und 24 h Bewegungsmazeration bei RT

| | Ch.: 0000027838 | | Ch.: 0000026867 | | Ch.: 0000026766 | |
|---|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| | 30 min | 24 h | 30 min | 24 h | 30 min | 24 h |
| Gehalt Saponine [mg/ 100mg pulv Droge] | 4,57 | 3,63 | 5,33 | 3,45 | 3,99 | 4,08 |
| Gehalt Saponine [mg/ 100mg conc Droge] | 2,05 | 3,48 | 5,62 | 4,21 | 1,81 | 3,25 |

Exemplarisch soll hier für beide Extraktionsmittel ein Chromatogramm der Gehaltsbestimmung von Isoferulasäure mittels HPLC-DAD (Abb. 20) und der HPLC-ELSD zur Gehaltsanalyse (Abb. 21) der Saponine gezeigt werden.

ERGEBNISSE

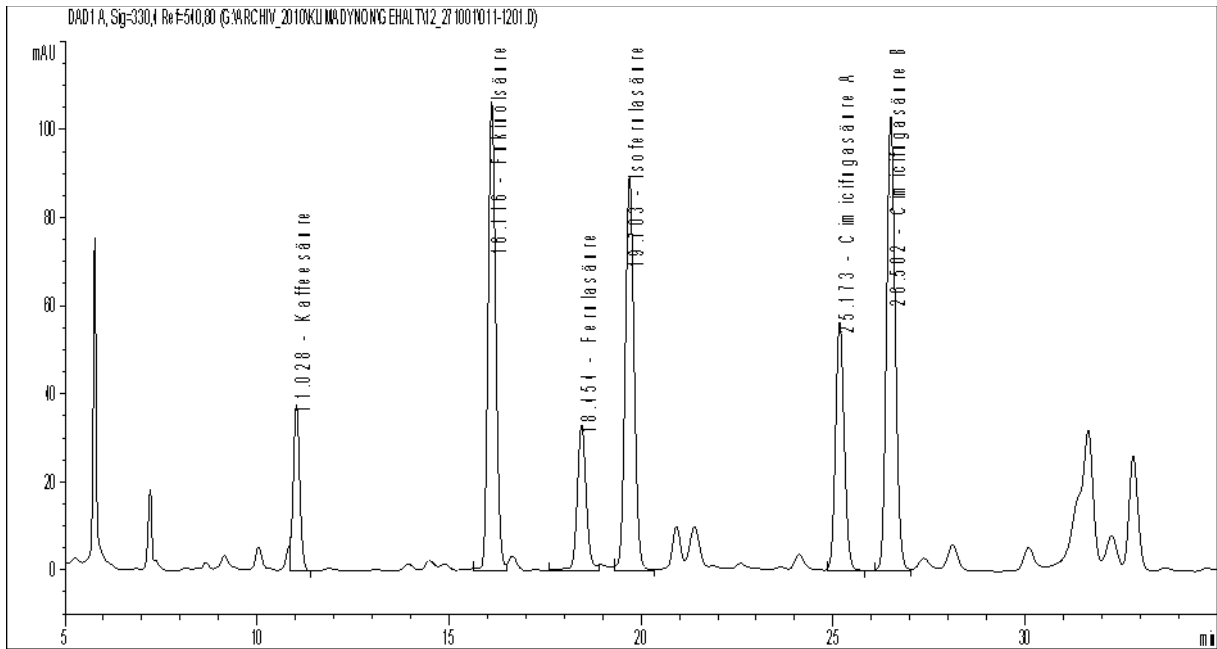


Abb. 20 HPLC-DAD-Chromatogramm der Gehaltsbestimmung der Isoferulasäure

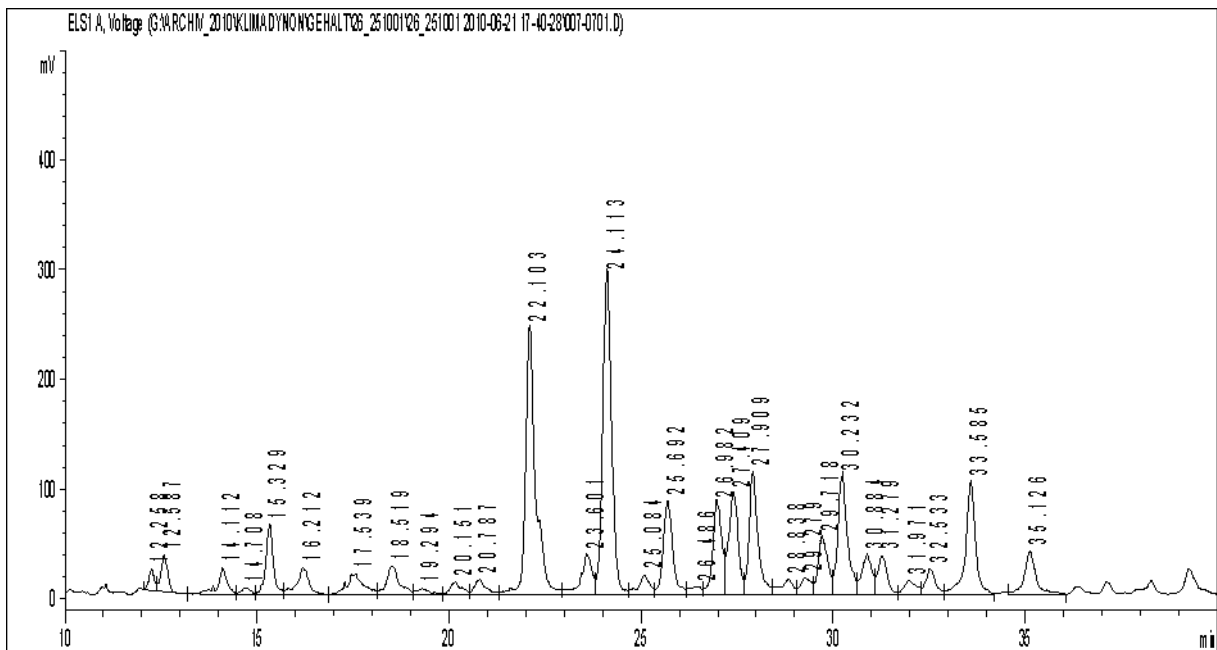


Abb. 21 HPLC-ELSD-Chromatogramm der Gehaltsbestimmung der Saponine in *Actaea rhizoma*

2. Fraktionierung von BNO 1055

Die Durchführung des Fraktionsprozesses wurde bereits in Kapitel B.5 erläutert. Einen kurzen Überblick gibt Abb. 22.

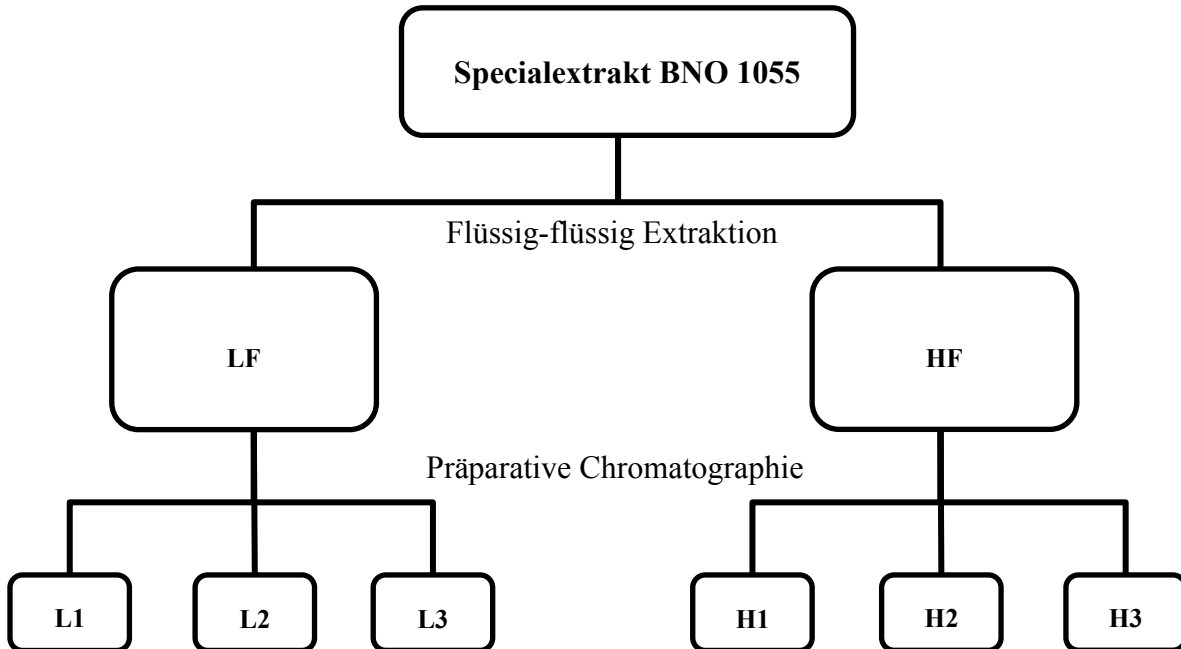


Abb. 22 Überblick über den Fraktionierungsprozess des Spezialextraktes BNO 1055

2.1. Gewinnung der Fraktionen

Die Kontrolle der erfolgreichen Trennung der lipophilen von den hydrophilen Stoffgruppen durch eine Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie kontrolliert. Als Methode diente hierfür TLC-Methode 02. Eine Kontroll-Analyse der 1. und 2. Fraktionierung der LF und HF Fraktion zusammen mit dem Gesamtextrakt zeigt Abb. 23.

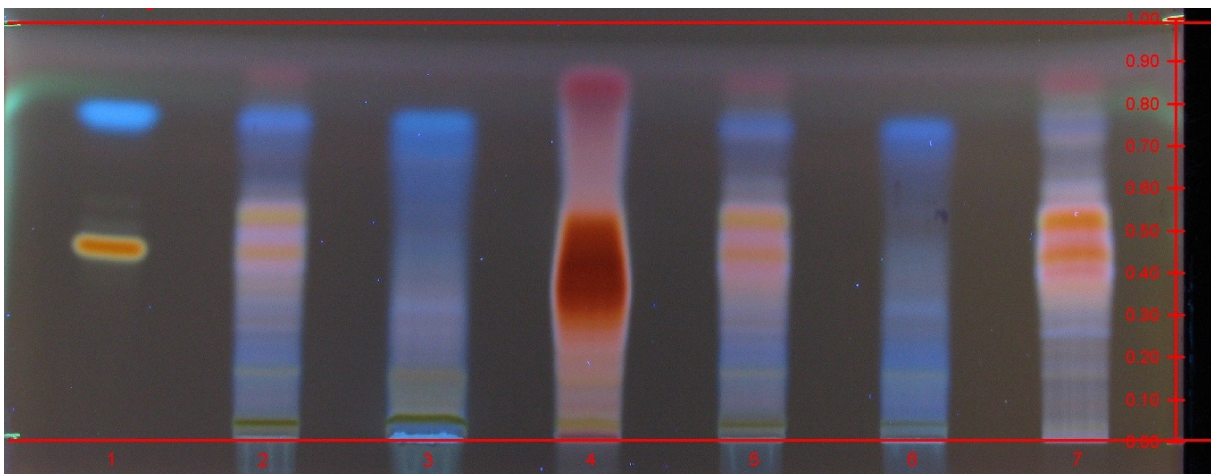


Abb. 23 TLC Kontrolle der LLE von BNO 1055 und deren lipophilen und hydrophilen Fraktionen

ERGEBNISSE

Probenschema zu Abb. 23:

1. Standard 27-Deoxyactein ($R_f = 0,45$) und Isoferulasäure ($R_f = 0,75$)
2. Gesamtextrakt BNO 1055 Fraktionierung 2
3. Hydrophile Fraktion Fraktionierung 2
4. Lipophile Fraktion Fraktionierung 2
5. Gesamtextrakt BNO 1055 Fraktionierung 1
6. Hydrophile Fraktion Fraktionierung 1
7. Lipophile Fraktion Fraktionierung 1

Die Proben 3 und 6 weisen deutlich ein Fehlen der Triterpenglycoside im R_f -Bereich von ca. 0,3 - 0,6 auf. In den Proben 4 und 7 sind hingegen die Banden der Phenylpropanoide nicht erkennbar, aber ein Vorhandensein der Saponine ist eindeutig erkennbar. Diese Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf den erfolgreichen ersten Fraktionierungsschritt mittels Flüssig-Flüssig-Verteilung zu. Die lipophilen Bestandteile konnten von den hydrophilen Bestandteilen getrennt werden. Dies wurde noch einmal mit einer LC-MS-Analyse bestätigt (Abb. 24).

Die aus der LLE gewonnenen Fraktionen werden im nächsten Schritt wie in Kapitel B.5.2. unterfraktioniert. Die Kontrolle der Fraktionierung und das Festlegen der Schnittpunkte, welche die 3 Unterfraktionen definieren, wird mit der TLC-Methode 02 durchgeführt, bei 366 nm für die lipophile Fraktion und bei Tageslicht, nach Tauchen in Anisaldehyd-Reagens, für die hydrophilen Fraktionen, durchgeführt. Die Ergebnisse der TLC-Analyse der ersten und zweiten Fraktionierung der lipophilen und hydrophilen Fraktionen sowie die eingezeichneten Schnittpunkte sind in den Abb. 25, Abb. 26, Abb. 27 und Abb. 28 aufgeführt.

ERGEBNISSE

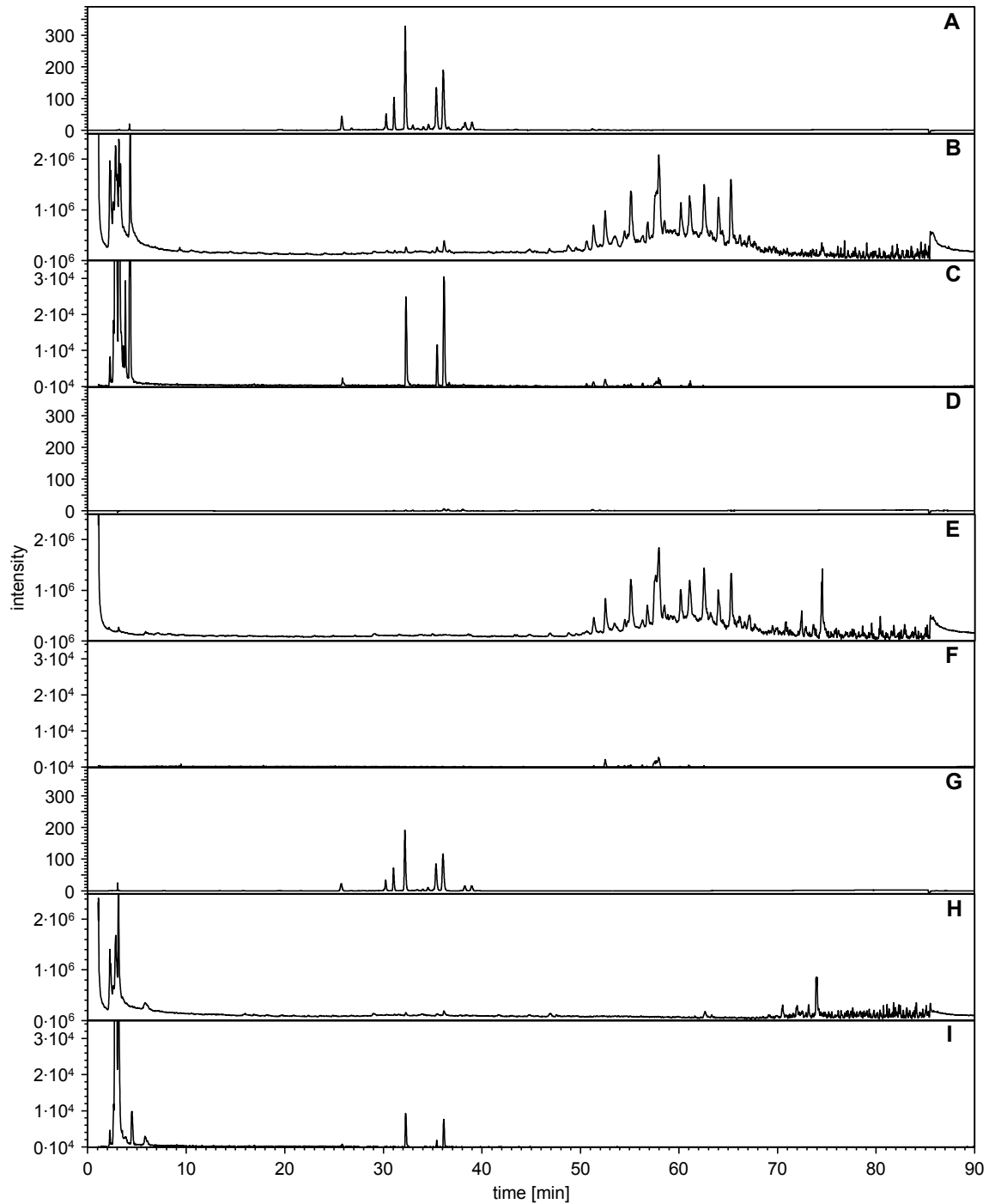


Abb. 24 LC-MS Chromatogramme des Gesamtextraktes (CR), der lipophilen Fraktion (LF) und der hydrophilen Fraktion (HF): DAD-Signal CR (A), MS-positiv CR (B), MS-negativ CR (C), DAD-Signal LF (D), MS-positiv LF (E), MS-negativ LF (F), DAD-Signal HF (G), MS-positiv HF (H), MS-negativ HF (I)

ERGEBNISSE

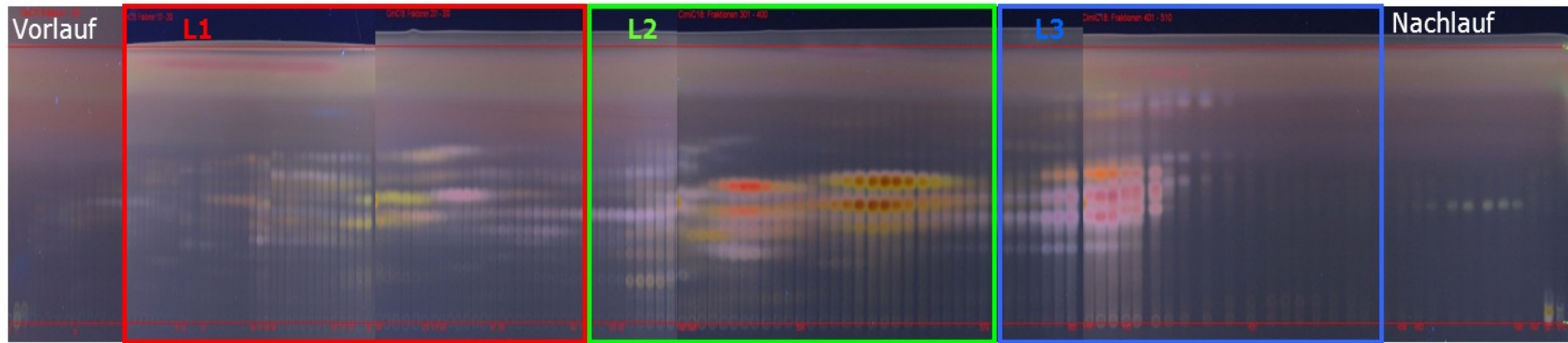


Abb. 25 TLC-Kontrolle der ersten Subfraktionierung der lipophilen Fraktion aufgenommen bei 366 nm nach Derivatisierung in modifiziertem Anisaldehyd. Aufgetragen ist jede 5te gesammelte Fraktion. Die einzelnen Unterfraktionen sind farblich markiert.

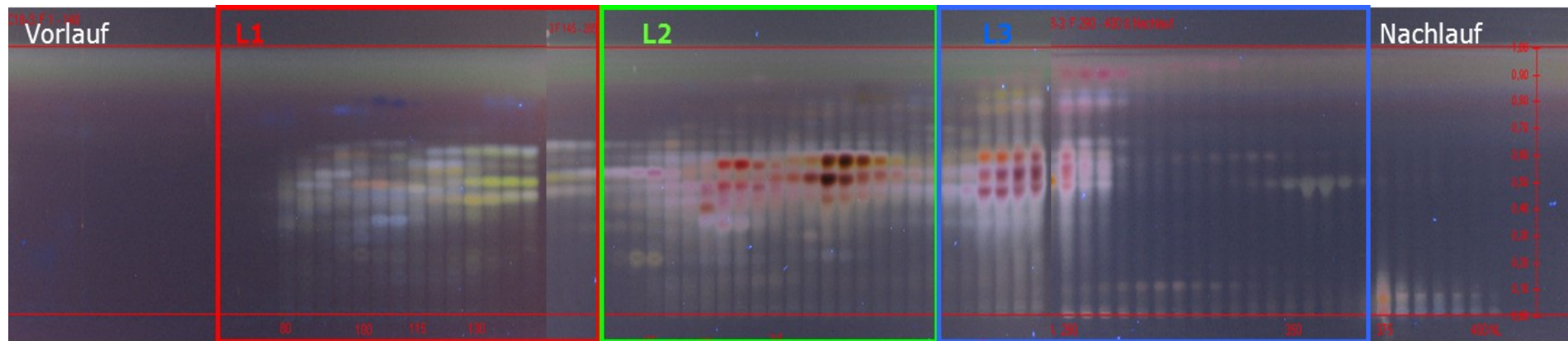


Abb. 26 TLC-Kontrolle der zweiten Subfraktionierung der lipophilen Fraktion aufgenommen bei 366 nm nach Derivatisierung in modifiziertem Anisaldehyd. Aufgetragen ist jede 5te gesammelte Fraktion. Die einzelnen Unterfraktionen sind farblich markiert.

ERGEBNISSE

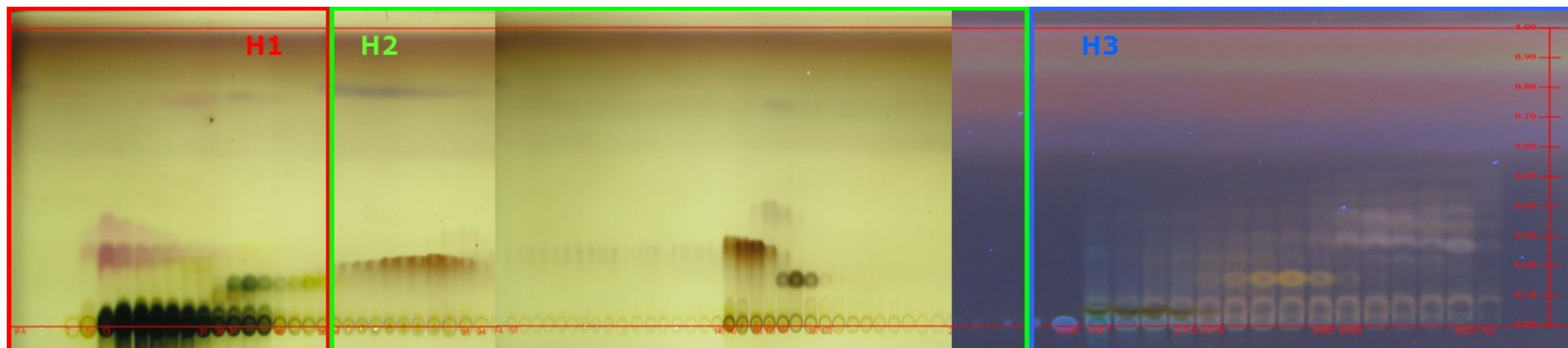


Abb. 27 TLC-Kontrolle der ersten Subfraktionierung der hydrophilen Fraktion aufgenommen bei Tageslicht und bei 366 nm nach Derivatisierung in modifiziertem Anisaldehyd. Aufgetragen ist jede 5te gesammelte Fraktion. Zur besseren Erkennung der Schnittpunkte der H3 Fraktion wurde diese Platte bei 366 nm aufgenommen. Die einzelnen Unterfraktionen sind farblich markiert.

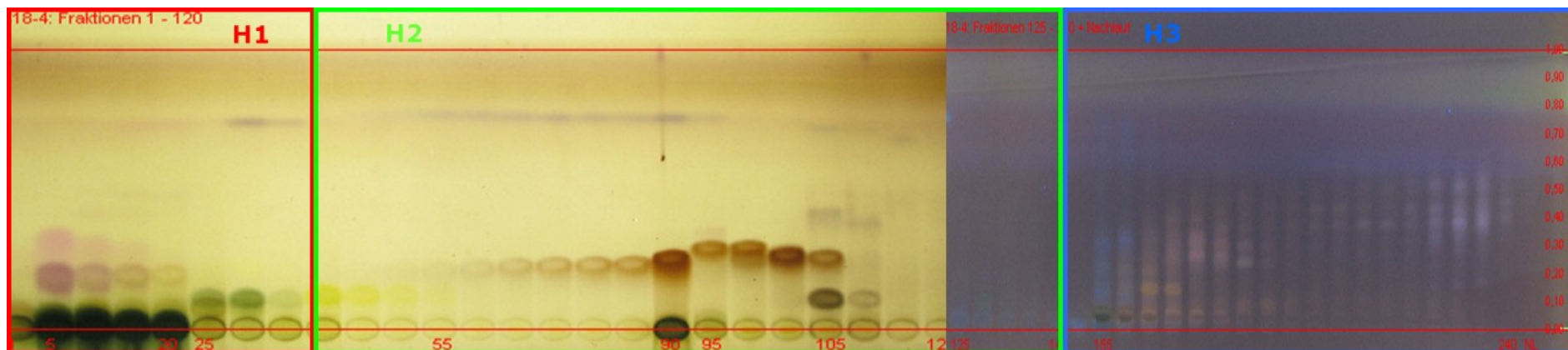


Abb. 28 TLC-Kontrolle der zweiten Subfraktionierung der hydrophilen Fraktion aufgenommen bei Tageslicht und bei 366 nm nach Derivatisierung in modifiziertem Anisaldehyd. Aufgetragen ist jede 5te gesammelte Fraktion. Zur besseren Erkennung der Schnittpunkte der H3 Fraktion wurde diese Platte bei 366 nm aufgenommen. Die einzelnen Unterfraktionen sind farblich markiert.

2.2. Charakterisierung der Subfraktionen

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde einerseits die erfolgreiche Fraktionierung kontrolliert und andererseits die Schnittpunkte der Unterfraktionen festgelegt. Um die Subfraktionen jedoch genauer zu analysieren, wurden diese mit sensitiveren Messmethoden untersucht.

Zuerst erfolgte eine Charakterisierung anhand eines Single-Quadrupole Massenspektrometers (HPLC-Methode 04). Hierbei dienten die Referenzsubstanzen, siehe Kapitel B.2.3, als Identifizierungsstandards. Im Weiteren wurden die Saponinfraktionen aufgrund des fehlenden Chromophor an einem Lichtstreuendetektor (HPLC-Methode 03) qualitativ und quantitativ untersucht. Die Abb. 29, Abb. 30 und Abb. 31 zeigen die Chromatogramme der Subfraktionen, aufgenommen mit den jeweiligen Methoden. Beschriftet sind alle Signale, die mit einem Referenzstandard eindeutig zugewiesen werden konnten.

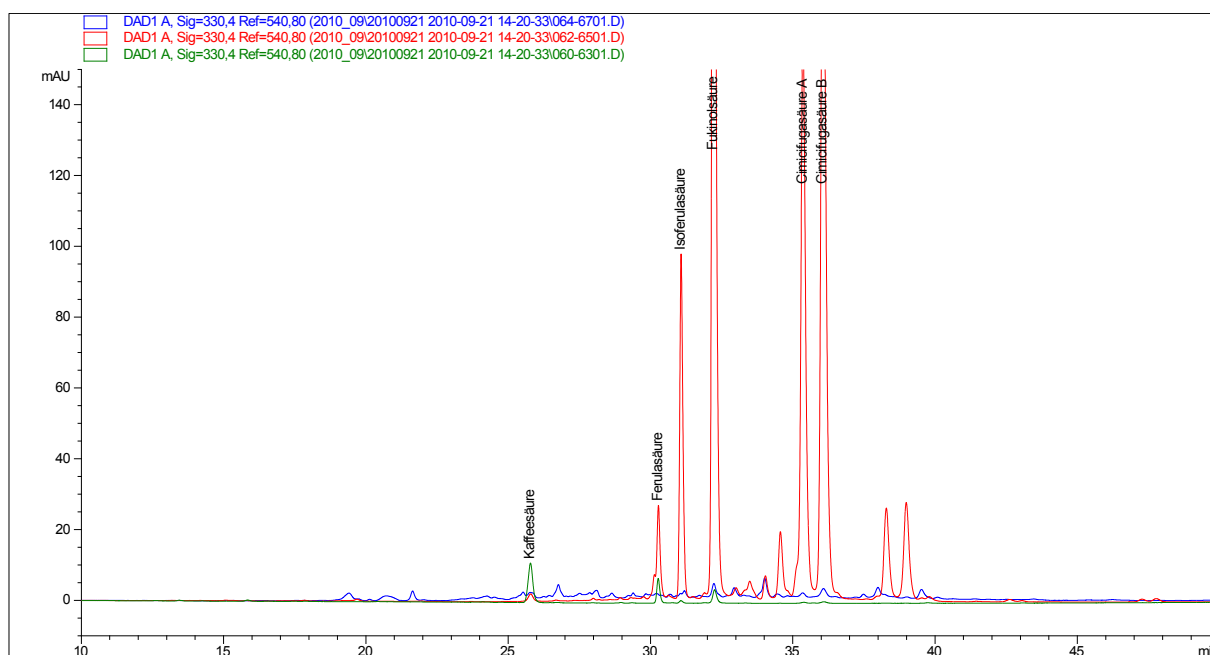


Abb. 29 HPLC-Methode 01 DAD-Chromatogram bei 330 nm. Signalzuweisung: H1-Fraktion (grün), H2-Fraktion (rot), H3-Fraktion (blau)

ERGEBNISSE

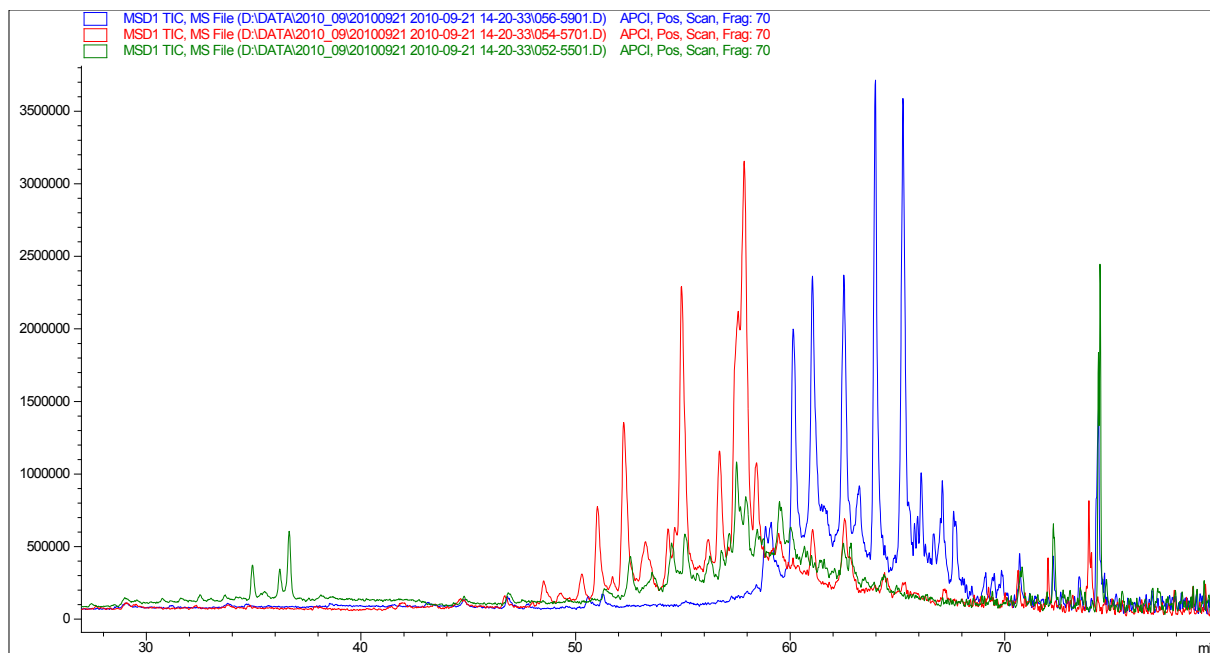


Abb. 30 HPLC-Methode 04 positives APCI Signal. Signalzuweisung: L1-Fraktion (grün), L2-Fraktion (rot), L3-Fraktion (blau)

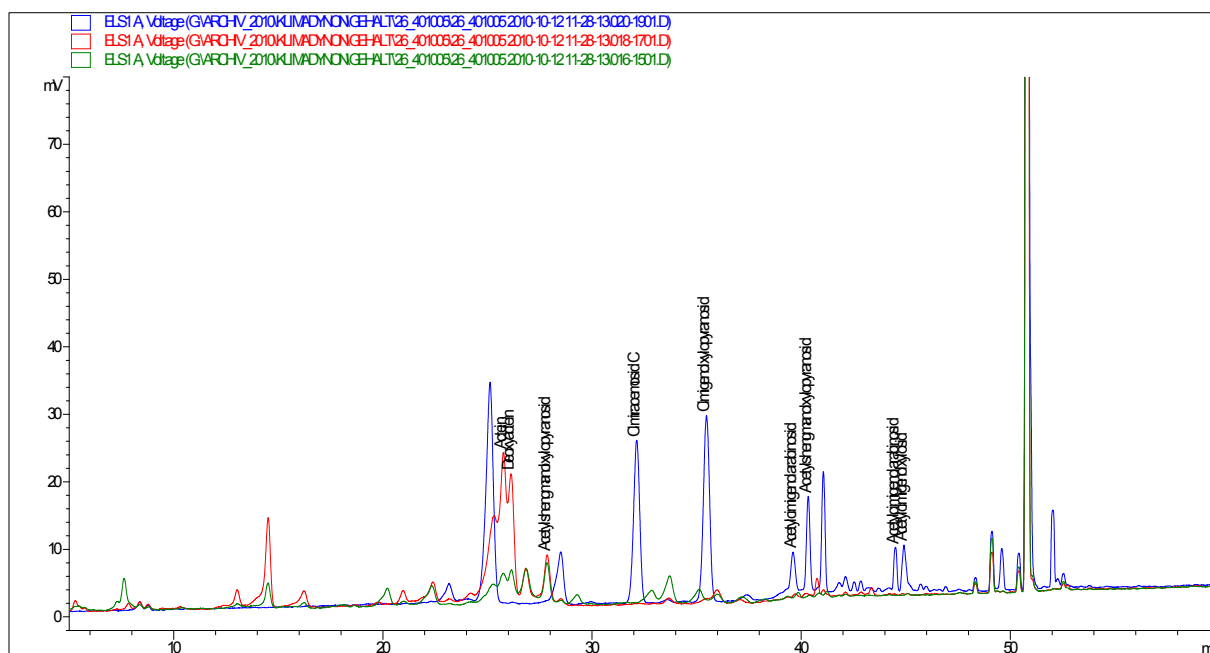


Abb. 31 HPLC-Methode 03 ELSD Signal. Signalzuweisung: L1-Fraktion (grün), L2-Fraktion (rot), L3-Fraktion (blau)

Um die weiteren Signale und Inhaltsstoffe zu charakterisieren, wurde der Extrakt mit der HPLC-Methode 07 untersucht. Hier dient ein hoch auflösendes Massenspektrometer zur Detektion von selbst nur im nanogram-Bereich vorhandenen Inhaltsstoffen. Die Abb. 32 und Abb. 33 zeigen die extrahierten Ionenspuren von Verbindungen aus BNO 1055, die anhand von Literaturdaten identifiziert werden konnten.

ERGEBNISSE

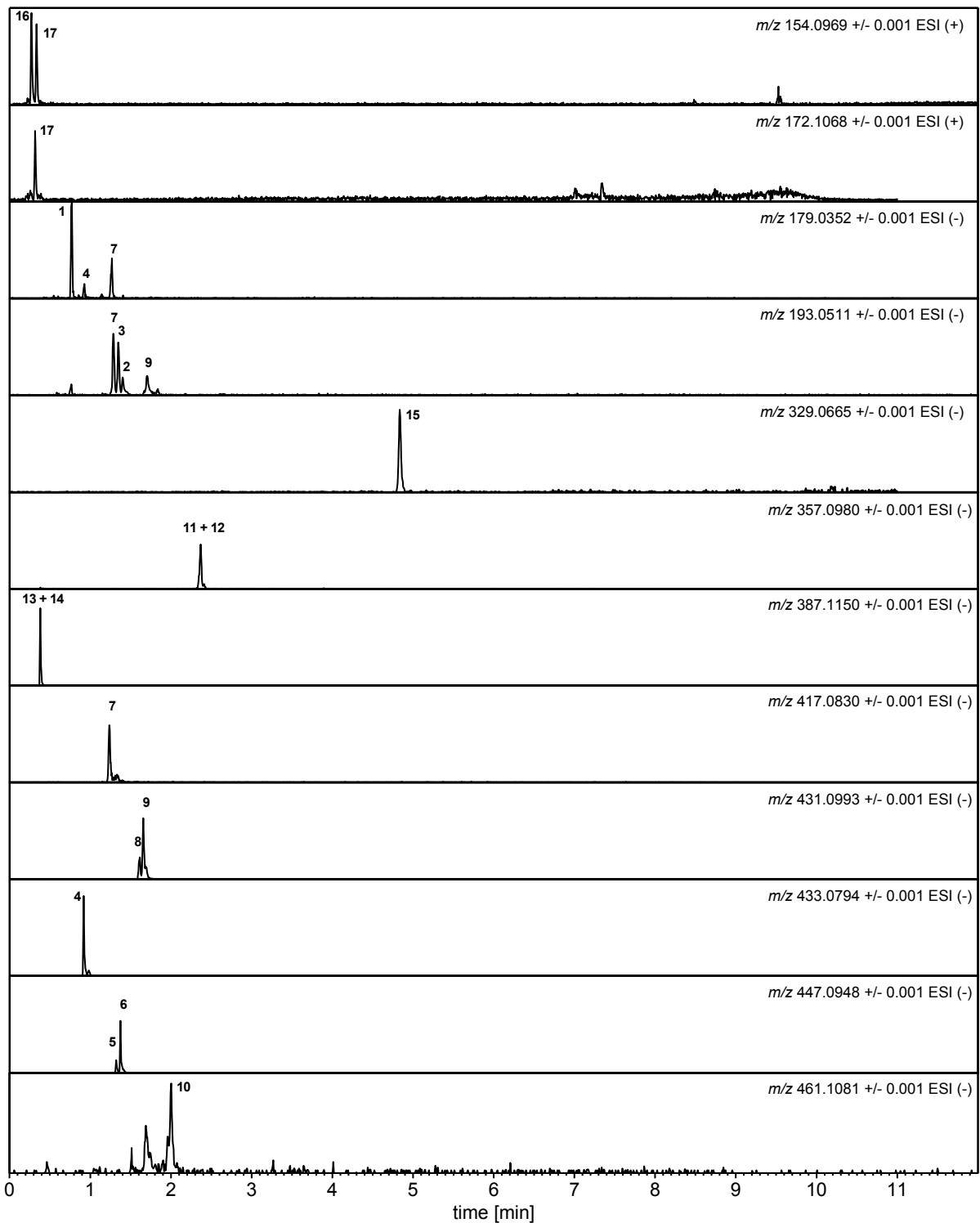


Abb. 32 Extrahierte Ionenspuren der hydrophilen Bestandteile von BNO 1055 aus *Actaea racemosa* rhizoma aufgenommen mittels LC/ToF-MS. Die Signalzuweisung erfolgte anhand der nummerierten Strukturformeln in Kapitel A.1.6 unter Zuhilfenahme von Literaturdaten

ERGEBNISSE

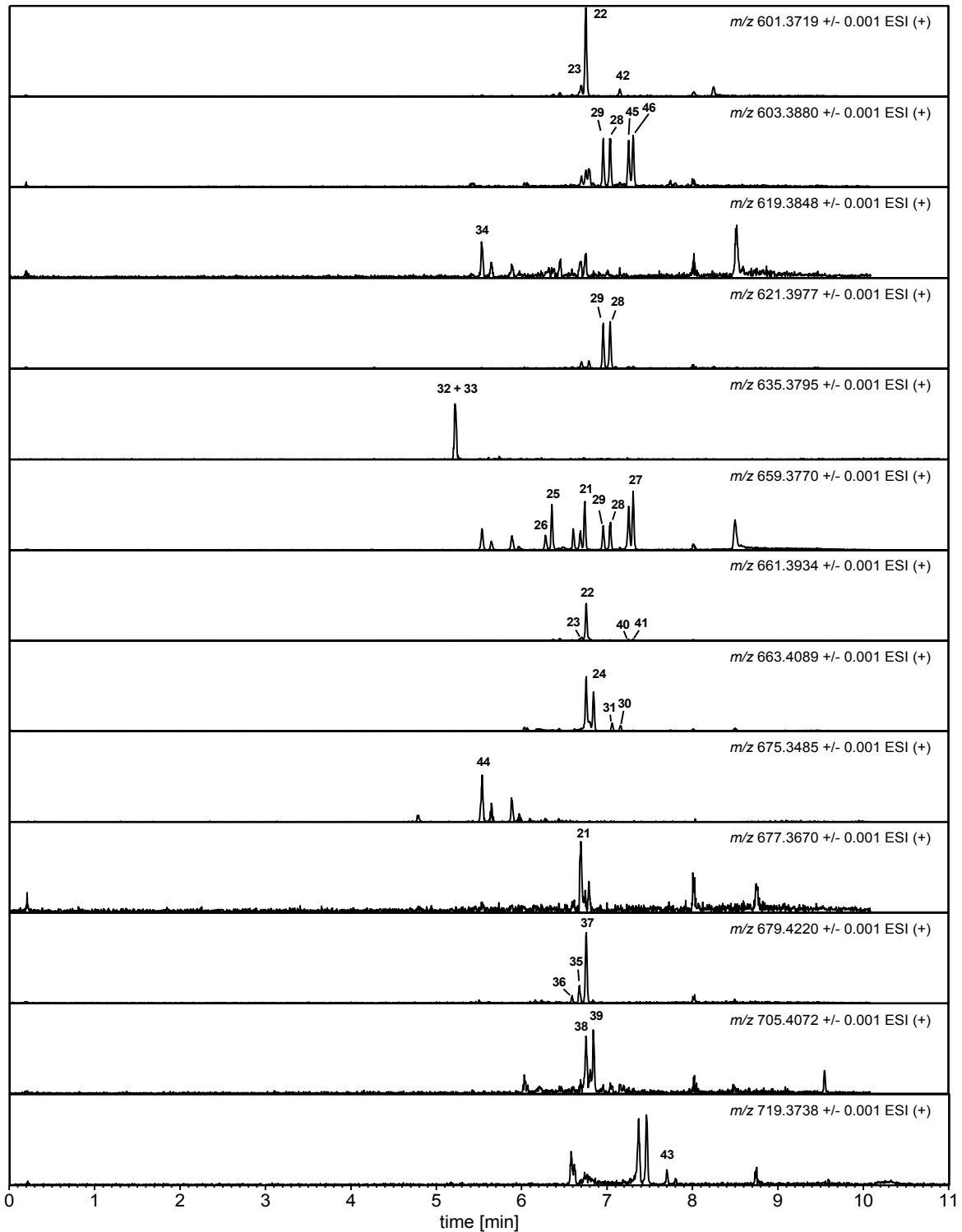


Abb. 33 Extrahierte Ionenspurten der lipophilen Bestandteile von BNO 1055 aus *Actaea racemosa* rhizoma aufgenommen mittels LC/ToF-MS. Die Signalzuweisung erfolgte anhand der nummerierten Strukturformeln in Kapitel A.1.6 unter Zuhilfenahme von Literaturdaten.

ERGEBNISSE

Aus diesen analytischen Ergebnissen kann für jede Fraktion ein bestimmtes Inhaltsstoffmuster ermittelt werden. Durch das sogenannte „Nachlaufen“ einiger Substanzen bei der präparativen Säulenchromatographie (im Unterschied zur analytischen SC) kommt es teilweise zu Überlappungen einzelner Inhaltsstoffe in den Fraktionen.

Einen Überblick über die Inhaltsstoffe in den jeweiligen Unterfraktionen, mit Angabe der Summenformel und dem zugehörigen Molekulargewicht, geben die nachstehenden Tabellen:

Tab. 9 Inhaltsstoffe der Fraktion H1

Inhaltsstoffe Fraktion H1

| Inhaltsstoff | Summenformel | Molekulargewicht [g/mol] |
|-------------------|--|-----------------------------|
| Cimipronidin | C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₂ | 171,1007 |
| Cyclocimipronidin | C ₇ H ₁₁ N ₃ O | 153,1817 |
| Fructose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180,1559 |
| Glucose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180,1559 |
| Myo-Inositol | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180,1559 |
| Raffinose | C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆ | 504,4371 |
| Saccharose | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | 342,2965 |

Tab. 10 Inhaltsstoffe der Fraktion H2

Inhaltsstoffe Fraktion H2

| Inhaltsstoff | Summenformel | Molekulargewicht [g/mol] |
|-------------------|---|-----------------------------|
| Cimicifugasäure A | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 448,3769 |
| Cimicifugasäure B | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 448,3769 |
| Cimicifugasäure D | C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀ | 418,3509 |
| Cimicifugasäure E | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ | 432,3775 |
| Cimicifugasäure F | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ | 432,3775 |
| Cimiracemat A" | C ₁₉ H ₁₈ O ₇ | 358,3420 |
| Cimiracemat B | C ₁₉ H ₁₈ O ₇ | 358,3420 |
| Cimiracemat C | C ₂₀ H ₂₀ O ₈ | 388,3680 |
| Cimiracemat D | C ₂₀ H ₂₀ O ₈ | 388,3680 |
| Ferulasäure | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | 194,1840 |
| Fukiinsäure | C ₁₁ H ₁₂ O ₈ | 272,2082 |
| Fukinolsäure | C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁ | 434,3503 |
| Isoferulasäure | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | 194,1840 |
| Kaffeesäure | C ₉ H ₈ O ₄ | 180,1574 |
| Piscidinsäure | C ₁₁ H ₁₂ O ₇ | 256,2088 |

ERGEBNISSE

Tab. 11 Inhaltsstoffe der Fraktion H3

Inhaltsstoffe Fraktion H3

| Inhaltsstoff | Summenformel | Molekulargewicht [g/mol] |
|-----------------------------|--------------|-----------------------------|
| Cimiciphenon | C18H16O7 | 344,3154 |
| N ω -Methylserotonin | C11H14N2O | 190,2416 |
| Petasiphenol | C18H16O7 | 344,3154 |
| Petasiphenon | C17H14O7 | 330,2888 |

Tab. 12 Inhaltsstoffe der Fraktion L1

Inhaltsstoffe Fraktion L1

| Inhaltsstoff | Summenformel | Molekulargewicht [g/mol] |
|-----------------|--------------|-----------------------------|
| Cimiracemat A" | C19H18O7 | 358,3420 |
| Cimiracemat B | C19H18O7 | 358,3420 |
| Cimiracemat C | C20H20O8 | 388,3680 |
| Cimiracemat D | C20H20O8 | 388,3680 |
| Cimiracemosid F | C37H56O11 | 676,3822 |
| Cimiracemosid G | C37H56O11 | 676,3822 |
| Cimiracemosid I | C35H52O8 | 600,3662 |
| Petasiphenon | C17H14O7 | 330,2888 |

Tab. 13 Inhaltsstoffe der Fraktion L2

Inhaltsstoffe Fraktion L2

| Inhaltsstoff | Summenformel | Molekulargewicht [g/mol] |
|---|--------------|-----------------------------|
| 23-O-Acetylshengmanol- 3-O- β -D-xylopyranosid | C37H58O10 | 662,4029 |
| 25-O-Methylcimigenol- 3-O-arabinopyranosid | C36H58O9 | 634,8403 |
| 25-O-Methylcimigenol- 3-O-xylopyranosid | C36H58O9 | 634,8403 |
| 26-Deoxycimicifugosid | C37H54O10 | 658,3716 |
| 27-Deoxyactein | C37H56O10 | 660,3873 |
| Actein | C37H56O11 | 676,3822 |
| Cimiacerosid A | C35H54O9 | 618,3767 |
| Cimiracemosid F | C37H56O11 | 676,3822 |
| Cimiracemosid G | C37H56O11 | 676,3822 |
| Cimiracemosid I | C35H52O8 | 600,3662 |
| Cimiracemosid J | C37H56O10 | 660,3873 |
| Cimiracemosid K | C37H56O10 | 660,3873 |
| Cimiracemosid L | C39H60O11 | 704,4135 |
| Cimiracemosid M | C39H60O11 | 704,4135 |
| Cimiracemosid N | C37H56O10 | 660,3873 |

ERGEBNISSE

Tab. 14 Inhaltsstoffe der Fraktion L3

Inhaltsstoffe Fraktion L3

| Inhaltsstoff | Summenformel | Molekulargewicht [g/mol] |
|--|--------------|-----------------------------|
| 25-O-Acetylcimigenol- arabinopyranosid | C37H58O10 | 662,8504 |
| 25-O-Acetylcimigenol- xylopyranosid | C37H58O10 | 662,8504 |
| 25-O-Anhydrocimigenol- arabinopyranosid | C35H54O8 | 602,7984 |
| 25-O-Anhydrocimigenol- xylopyranosid | C35H54O8 | 602,7984 |
| Cimigenol-xylopyranosid | C35H56O9 | 620,3924 |
| Cimiracemosid C | C35H56O9 | 620,3924 |

ERGEBNISSE

Tab. 15 Gesamtübersicht der Inhaltsstoffe in *A. racemosa*

Übersicht Inhaltsstoffe *Actaea racemosa*

| Inhaltsstoff | Summenformel | Molekulargewicht [g/mol] | Struktur- formel |
|---|--------------|-----------------------------|---------------------|
| Cyclocimipronidin | C7H11N3O | 153,2 | 17 |
| Cimipronidin | C7H13N3O2 | 171,1 | 16 |
| Fructose | C6H12O6 | 180,2 | 49 |
| Glucose | C6H12O6 | 180,2 | 48 |
| Myo-Inositol | C6H12O6 | 180,2 | 50 |
| Kaffeesäure | C9H8O4 | 180,1 | 1 |
| N ω -Methylserotonin | C11H14N2O | 190,2 | 18 |
| Ferulasäure | C10H10O4 | 194,2 | 2 |
| Isoferulasäure | C10H10O4 | 194,2 | 3 |
| Petasiphenon | C17H14O7 | 330,3 | 15 |
| Saccharose | C12H22O11 | 342,3 | 47 |
| Cimiracemat A" | C19H18O7 | 358,3 | 11 |
| Cimiracemat B | C19H18O7 | 358,3 | 12 |
| Cimiracemat C | C20H20O8 | 388,4 | 13 |
| Cimiracemat D | C20H20O8 | 388,4 | 14 |
| Cimicifugasäure D | C20H18O10 | 418,4 | 7 |
| Cimicifugasäure E | C21H20O10 | 432,4 | 8 |
| Cimicifugasäure F | C21H20O10 | 432,4 | 9 |
| Fukinolsäure | C20H18O11 | 434,4 | 4 |
| Cimicifugasäure A | C21H20O11 | 448,4 | 5 |
| Cimicifugasäure B | C21H20O11 | 448,4 | 6 |
| Raffinose | C18H32O16 | 504,4 | 51 |
| Cimiracemosid I | C35H52O8 | 600,4 | 42 |
| 25-O-Anhydrocimigenol-arabinoosid | C35H54O8 | 602,8 | 45 |
| 25-O-Anhydrocimigenol-xylopyranosid | C35H54O8 | 602,8 | 46 |
| Cimiacerosid A | C35H54O9 | 618,4 | 34 |
| Cimigenol-xylopyranosid | C35H56O9 | 620,4 | 28 |
| Cimiracemosid C | C35H56O9 | 620,4 | 29 |
| 25-O-Methylcimigenol-3-O-arabinosid | C36H58O9 | 634,8 | 33 |
| 25-O-Methylcimigenol-3-O-xylopyranosid | C36H58O9 | 634,8 | 32 |
| 26-Deoxycimicifugosid | C37H54O10 | 658,4 | 27 |
| 27-Deoxyactein | C37H56O10 | 660,4 | 22 |
| Cimiracemosid J | C37H56O10 | 660,4 | 40 |
| Cimiracemosid K | C37H56O10 | 660,4 | 41 |
| Cimiracemosid N | C37H56O10 | 660,4 | 23 |
| 23-O-Acetylshengmanol-3-O- β -D-xylopyranosid | C37H58O10 | 662,4 | 24 |
| 25-O-Acetylcimigenol-arabinosid | C37H58O10 | 662,8 | 31 |
| 25-O-Acetylcimigenol-xylopyranosid | C37H58O10 | 662,8 | 30 |
| Actein | C37H56O11 | 676,4 | 21 |
| Cimiracemosid F | C37H56O11 | 676,4 | 25 |
| Cimiracemosid G | C37H56O11 | 676,4 | 26 |
| Cimiracemosid L | C39H60O11 | 704,4 | 38 |
| Cimiracemosid M | C39H60O11 | 704,4 | 39 |

2.3. Reproduzierbarkeit des Fraktionierungsprozesses

Um zu belegen, dass das Fraktionierungsverfahren reproduzierbar ist, wurde der gesamte Prozess an einem weiteren Spezialextrakt BNO 1055 Charge C005 durchgeführt. Die Abb. 34 belegt die Übereinstimmung der beiden Spezialextrakte C001 und C005 bezüglich des Inhaltsstoffmusters, gemessen mit der HPLC-Methode 03.

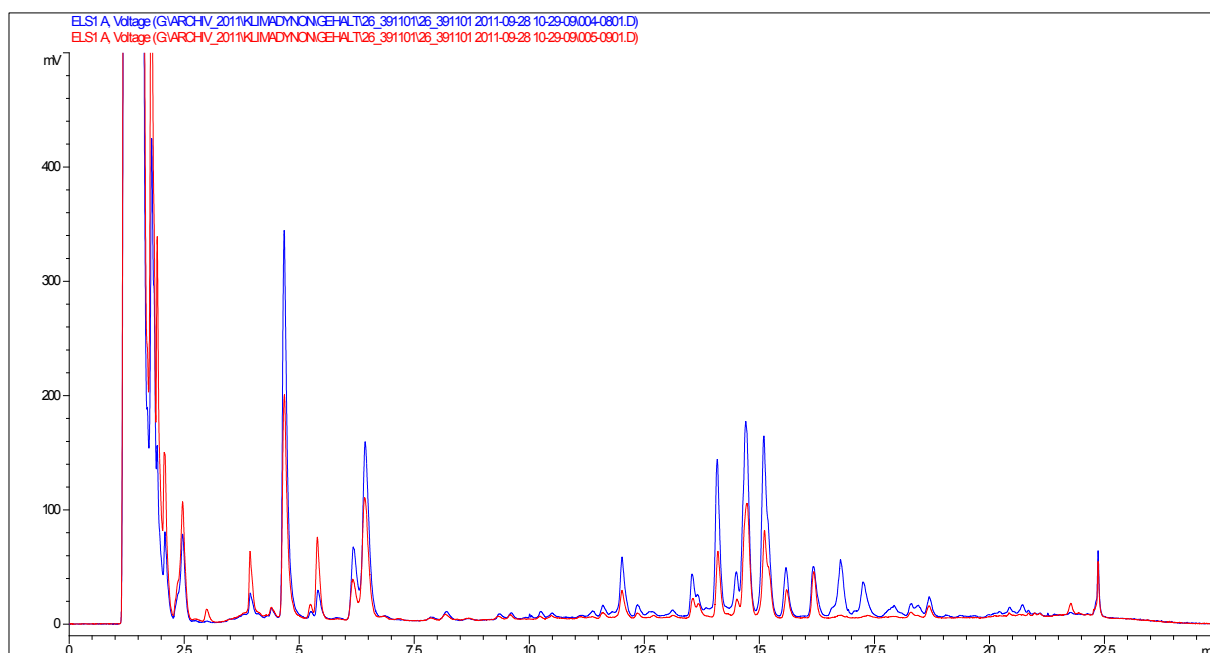


Abb. 34 HPLC-ELSD Chromatogramm der HPLC-Methode 03 von BNO 1055 C001 (blau) und BNO 1055 C005 (rot)

In den Abb. 35, Abb. 36, Abb. 37 und Abb. 38 sind die ELSD-Chromatogramme der Fraktionen aus C001 und C005 übereinander gelegt, um die Übereinstimmung und die Reproduzierbarkeit des Herstellungsschrittes zu belegen. Die einzelnen Fraktionen zeigen in ihren Fingerprints ein identisches Muster auf. Nur in Fraktion L 1 sind Unterschiede erkennbar, die in einem langsamen chromatographischen Trennverfahren durch eine dicht gepackte Glassäule begründet sind. Die Trennung verlief dadurch sehr langsam, wodurch es qualitativ aber zu keiner Beeinflussung kam.

ERGEBNISSE

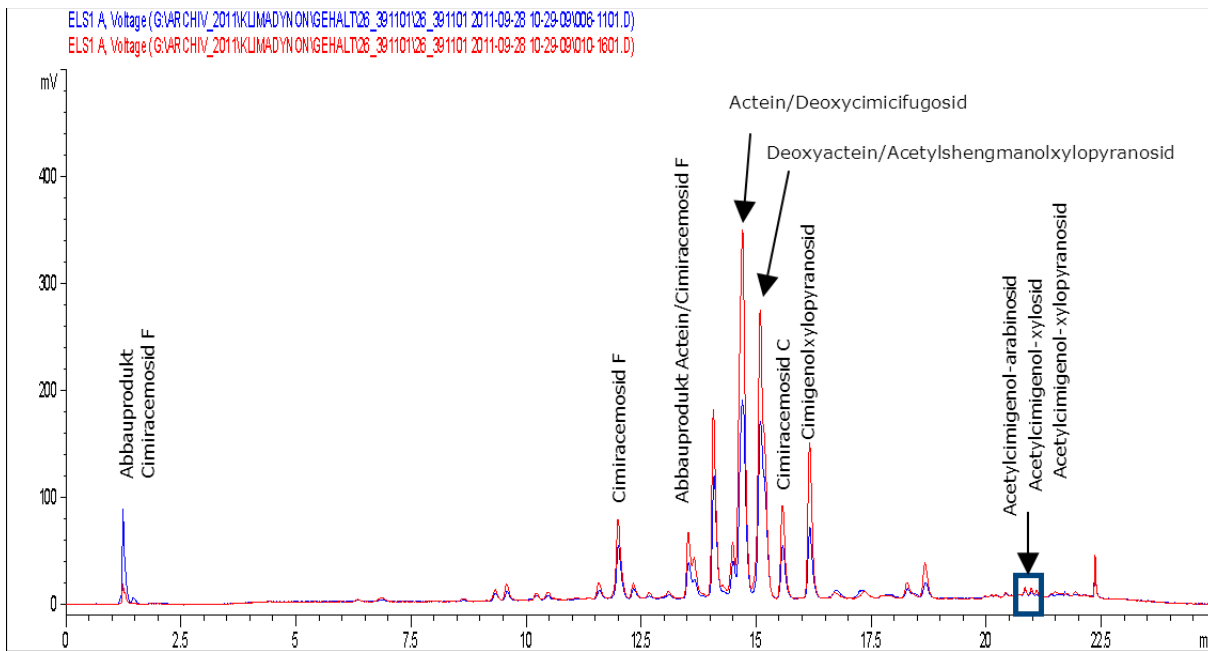


Abb. 35 HPLC-ELSD Chromatogramm der HPLC-Methode 03 von C001/LF (blau) und C005/LF (rot)

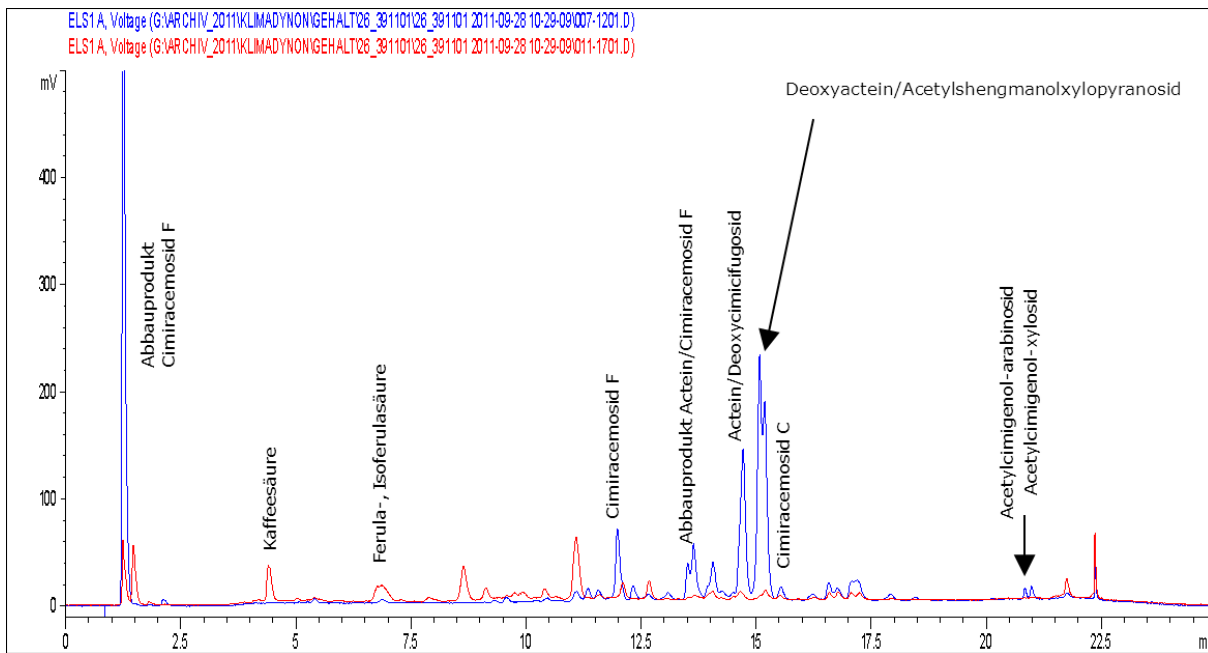


Abb. 36 HPLC-ELSD Chromatogramm der HPLC-Methode 03 von C001/L1 (blau) und C005/L1 (rot)

ERGEBNISSE

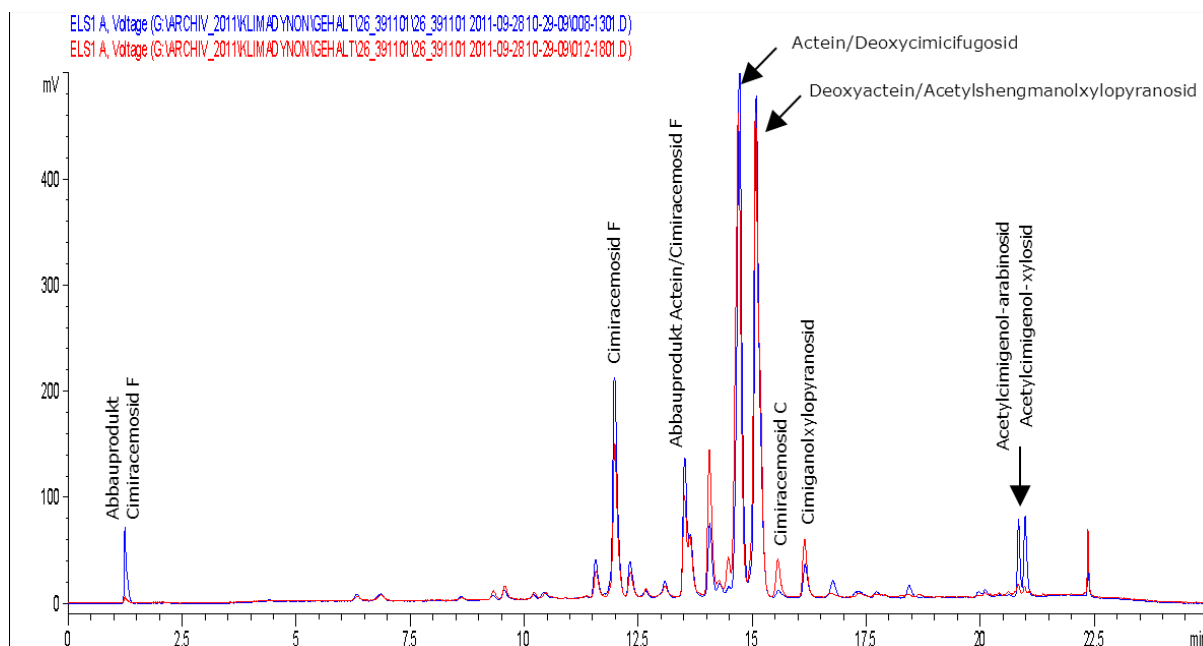


Abb. 37 HPLC-ELSD Chromatogramm der HPLC-Methode 03 von C001/L2 (blau) und C005/L2 (rot)

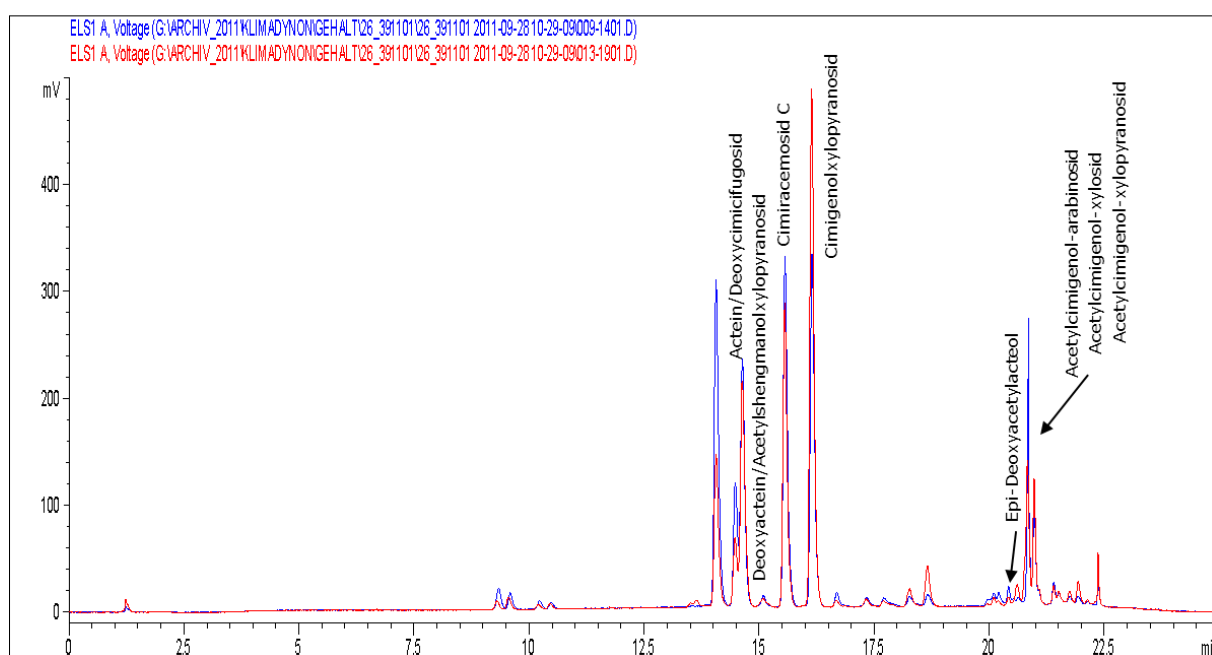


Abb. 38 HPLC-ELSD Chromatogramm der HPLC-Methode 03 von C001/L3 (blau) und C005/L3 (rot)

Gleichzeitig erfolgte eine Quantifizierung der Gesamtheit an Triterpenglycosiden der lipophilen Fraktionen mit der HPLC-Methode 03. Als Gehaltsstandard wurde dabei Monoammoniumglycerrhizat verwendet und die Gesamtheit der Saponine darüber quantifiziert, analog zur aktuellen Ph.Eur. Monographie zu *A. racemosa*.

Die Gehalte der Saponine von C001 und C005 bestätigen, dass der Fraktionierungsprozess wiederholbar ist und auf einfache Weise Fraktionen hergestellt werden können, welche mit

ERGEBNISSE

bestimmten Inhaltsstoffen angereichert sind. In Tab. 16 sind die Gehalte an Triterpenglycosiden in C001 und C005 und den aus ihnen hergestellten Fraktionen aufgelistet. Verglichen wird die erste und die zweite Fraktionierung von BNO 1055 C001 sowie die Fraktionierung von BNO 1055 C005.

Tab. 16 Gehaltsbestimmung der Gesamtheit der Saponine in C001 und C005 sowie deren Unterfraktionen, gemessen mit der HPLC-Methode 03. Detektion: ELSD. Gehalte sind angegeben in mg/100 mg Trockenextrakt

| | BNO 1055 | LF | L1 | L2 | L3 |
|----------------------------|----------|------|-------|------|------|
| 1. Fraktionierung C001 | | | | | |
| Saponingehalt in mg/100 mg | 5,8 | 45,4 | 41 | 42,2 | 41,1 |
| 2. Fraktionierung C001 | | | | | |
| Saponingehalt in mg/100 mg | 5,8 | 42,4 | 43,3 | 44,9 | 43,3 |
| Fraktionierung C005 | | | | | |
| Saponingehalt in mg/100 mg | 4 | 36,6 | 13,5* | 43,6 | 36,1 |

* technisch bedingt

Des Weiteren wurde die Ausbeute an lyophilisierten Fraktionen gravimetrisch bestimmt und verglichen. In Tab. 17 sind die Ergebnisse der Auswaage der Subfraktionen aufgeführt. Die Massenanteile wurden auf 100 g des Spezialextraktes BNO 1055 bezogen. Es zeigt sich, dass C005 einen höheren Anteil an hydrophilen Inhaltsstoffen als C001 aufweist. Dies ist vermutlich auf einen höheren Zuckergehalt in C005 zurückzuführen und damit einem höheren Gewicht der hydrophilen Fraktion H1.

ERGEBNISSE

Tab. 17 Gravimetrische Analyse der Fraktionen von BNO 1055 C001 und C005

| <u>Lipophile Fraktion</u> | C001/LF | C001/L1 | C001/L2 | C001/L3 |
|---|---------|---------|---------|---------|
| Fraktionierung C001 | | | | |
| Massenanteile in g bezogen auf 100 g Trockenextrakt | 18,2 | 2,9 | 8 | 6,2 |
| | C005/LF | C005/L1 | C005/L2 | C005/L3 |
| Fraktionierung C005 | | | | |
| Massenanteile in g bezogen auf 100 g Trockenextrakt | 10,4 | 0,6 | 5,7 | 3,7 |

| <u>Hydrophile Fraktion</u> | C001/HF | C001/H1 | C001/H2 | C001/H3 |
|---|---------|---------|---------|---------|
| Fraktionierung 20100812 von C001 | | | | |
| Massenanteile in g bezogen auf 100 g Trockenextrakt | 54,9 | 39 | 6,4 | 5,1 |
| | C005/HF | C005/H1 | C005/H2 | C005/H3 |
| Fraktionierung C005 | | | | |
| Massenanteile in g bezogen auf 100 g Trockenextrakt | 66,3 | 47 | 5,5 | 6 |

3. Pharmakologischer Teil

3.1. Osteoprotektive Aktivität

Die Versuche zur osteoprotektiven Aktivität der *Cimicifuga*-Fraktionen wurden in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen untersucht. Es handelte sich dabei um ein Entwicklungsprojekt, gefördert unter dem Aktenzeichen AZ-838-08 von der Bayerischen Forschungstiftung. Die osteoprotektive Aktivität wurde in der Arbeitsgruppe Endokrinologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. W. Wuttke analysiert. Die Ergebnisse des *in vivo* Rattenversuchs wurden von Frau Dr. med. Lea Laß in ihrer Dissertation „Antiosteoporotische Prinzipien in *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001 und ihren Fraktionen“ bereits ausführlich diskutiert und dargestellt [45]. Zum Verständnis und für die weitere Diskussion in dieser Arbeit sollen die Ergebnisse hier noch einmal kurz wiedergegeben werden.

3.1.1. Futteraufnahme und Körpergewicht

Bei Versuchsbeginn wiesen alle Versuchstiere ein Gewicht zwischen 245 und 295 g auf. Nach vierwöchiger Futteraufnahme konnte in den jeweiligen Versuchsgruppen ein durchschnittliches Körpergewicht zwischen 351 und 357 g gemessen werden. Der Gewichtszuwachs war jedoch nicht proportional zu der durchschnittlichen Futteraufnahme pro Tier pro Tag der einzelnen Gruppen. Die Tiere der Saponinfraktion haben am meisten Futter zu sich genommen, den größten Gewichtszuwachs verzeichnete aber die ovariectomierte Kontrollgruppe.

3.1.2. Einfluss auf Knochengewebe

Die Metaphyse der Tibia reagiert besonders sensibel auf den Entzug von Östrogenen, deshalb wurde diese Struktur Computer-tomographisch und histomorphometrisch untersucht. Die getesteten Substanzen wurden den Tieren unmittelbar nach Entfernen der Eierstöcke per Futter ad libitum verabreicht.

Die Negativ-Kontrollgruppe entwickelte eine hochgradige Osteoporose, welche durch die Gabe von 17 β -Östradiol (Positiv-Kontrollgruppe) verhindert wurde. Der Gesamtextrakt C001 zeigte eindeutig osteoprotektive Wirkungen. Sowohl der Abbau der Ovariectomie induzierten, computertomographisch bestimmten trabekulären Dichte war durch den *A. racemosa*

ERGEBNISSE

Trockenextrakt gegenüber den Kontrolltieren deutlich vermindert als auch das histomorphometrisch gemessene Trabekelgeflecht verbessert.

In der L-Fraktion waren durch qCT sowie histomorphometrisch osteoprotektive Aktivitäten nachweisbar [42, 64].

Die computertomographische Bestimmung der Knochendichte der Metaphyse der Tibia ergab das Ergebnis, dass insbesondere die L 2 Fraktion für die osteoprotektive Wirkung verantwortlich war. Interessanterweise wurde nach Aufreinigung der H-Fraktion auch in der H 3 Fraktion eine recht prominente osteoprotektive Wirkung festgestellt. Diese Ergebnisse sind in der Abb. 39 und Abb. 40 dargestellt.

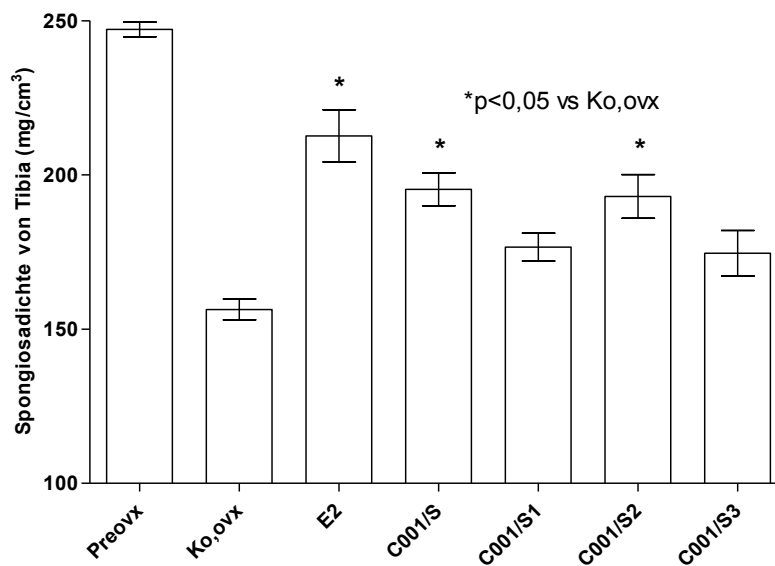


Abb. 39 qCT Messungen der Spongiosadichte der Tibia, aufgezeigt sind die Ergebnisse der lipophilen Fraktionen, hier anstatt L-Fractionen als S-Fractionen benannt

ERGEBNISSE

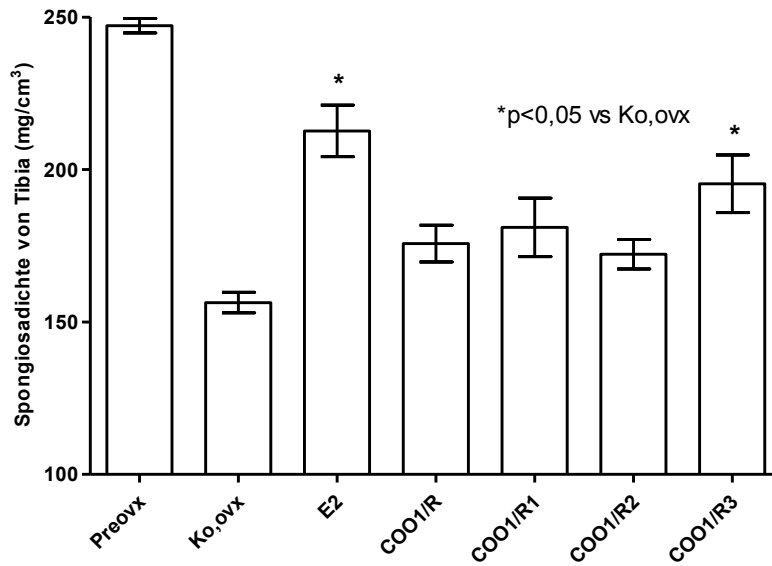


Abb. 40 qCT Messungen der Spongiosadichte der Tibia, aufgezeigt sind die Ergebnisse der hydrophilen Fraktionen, hier anstatt H-Fractionen als R-Fractionen benannt

Die Arbeiten zur osteoprotektiven Aktivität von *Actaea racemosa* wurden in Kooperation von dem Endokrinologischen Institut des Universitätsklinikum Göttingen und dem Orthopädischem Zentrum für Muskuloskeletale Forschung durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Weitere Ergebnisse wurden hierzu bereits in Doktorarbeiten, Publikationen und Posterpräsentationen veröffentlicht [42, 64, 65]

3.2. Caco-2 Permeabilitätsassay

3.2.1. Löslichkeitsversuche

Das Caco-2 Modell ist ein etabliertes in vitro Verfahren zur Untersuchung der Permeabilität von oral verabreichten Arzneistoffen und deren Resorption aus dem Darmlumen. Mit diesem Modell soll die Permeabilität der lipophilen Triterpenglycoside untersucht werden. Da diese Stoffgruppe sehr schlecht in wässrigen Medien löslich ist, muss vor den Untersuchungen ein Löslichkeitsversuch mit dem eingesetzten Puffermedium (modifiziertem FaSSIF) durchgeführt werden.

Die Abb. 41 und Abb. 42 zeigen diese Lösungen:



Abb. 41 Löslichkeit von C001 in Ethanol 50 % (m/m)

ERGEBNISSE



Abb. 42 Löslichkeit von C001 in FaSSIF-Puffer, Schaumbildung aufgrund des hohen Lipidgehalts des FaSSIF-Puffers

Die Proben wurden anschließend mit der HPLC-Methode 06 gemessen und die Gehalte an 27-Deoxyactein ermittelt und gegeneinander verglichen. Abb. 43 zeigt die gemessenen Werte des Löslichkeitsversuchs in Ethanol 50 % (m/m) sowie im apikalen Puffermedium FaSSIF. Die ethanolischen Proben zeigen geringe Schwankungen in den Gehalten. Der Variationskoeffizient liegt hier bei 6,6 %, was bei einer LC-MS Methode im akzeptablen Bereich liegt. In den Proben der apikalen Pufferlösung ist ein Trend zur Abnahme der Konzentration des Analyten deutlich zu erkennen. In der Lösung mit 2 g/L kann, verglichen mit den Werten der Ethanol-Lösungen, jedoch davon ausgegangen werden, dass die zu quantifizierende Substanz komplett in Lösung gegangen ist (Abb. 43, Abb. 44). Anhand dieser Ergebnisse wird für die Durchführung der Permeabilitätsversuche die maximal einsetzbare Konzentration von 2 g/L des Trockenextraktes C001 und C005 festgesetzt, suspendiert in apikalen FaSSIF-Puffer. Abb. 44 zeigt eine Gegenüberstellung der Gehalte an 27-Deoxyactein in ethanolischer Extraktionslösung und in apikalem Transportmedium der beiden zu untersuchenden Trockenextrakte C001 und C005.

ERGEBNISSE

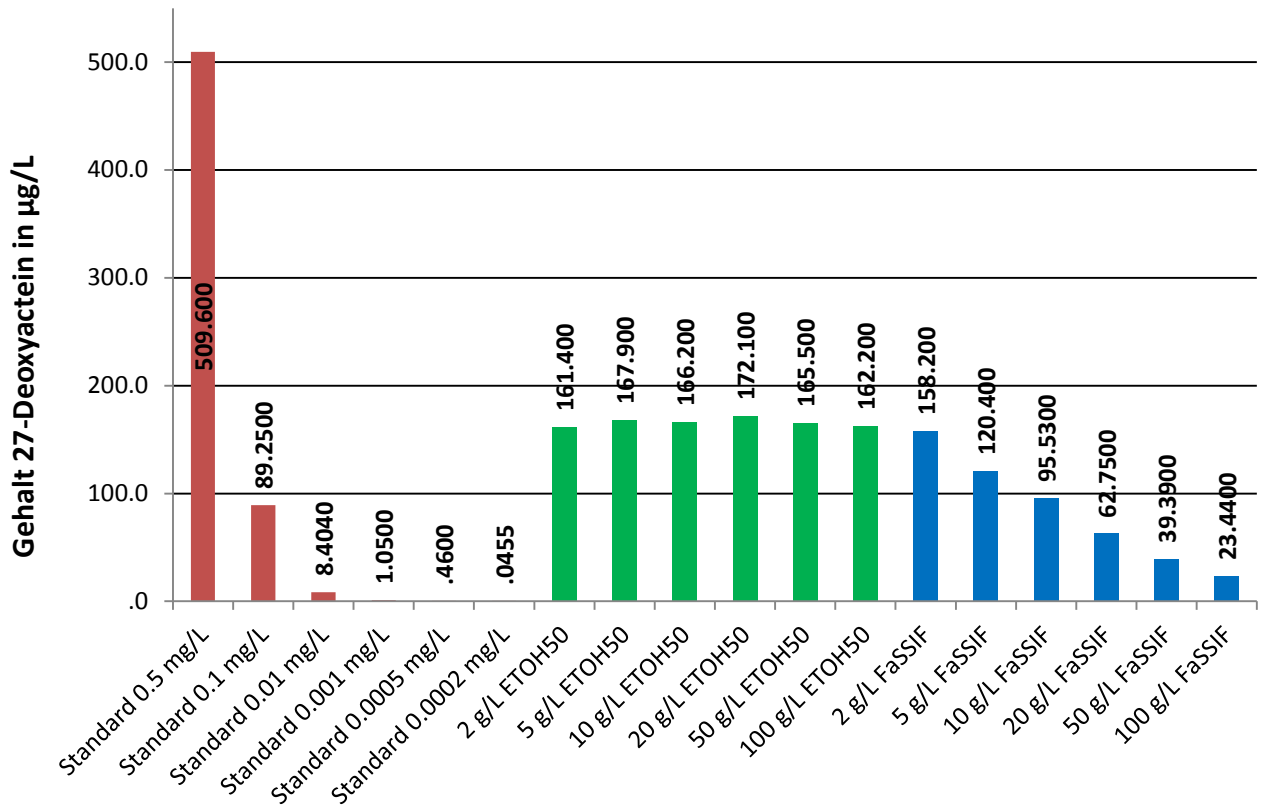


Abb. 43 Gehalt an 27-Deoxyactein in den Löslichkeitsversuchen von C001, Werte angegeben in µg/L

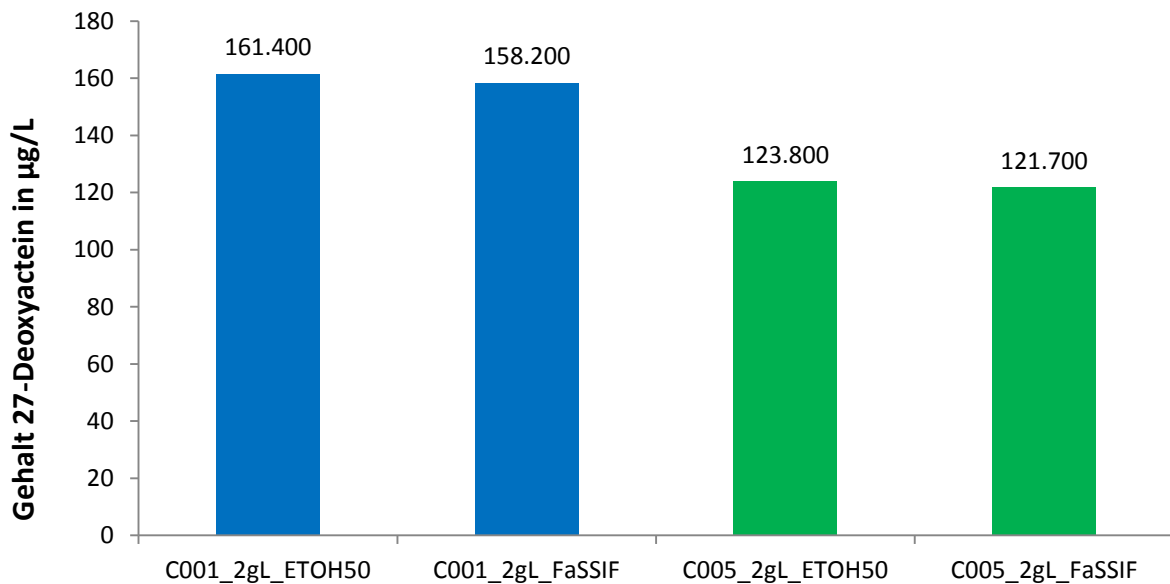


Abb. 44 Vergleich der Gehalte an 27-Deoxyactein in C001 und C005 einer 2 g/L Lösung extrahiert in Ethanol 50 % (m/m) und apikaler Pufferlösung (FaSSiF), Werte angegeben in µg/L

ERGEBNISSE

3.2.2. Methodenvalidierung Quantifizierung von 27-Deoxyactein

Die Validierung der massenspektroskopischen Methode zur Quantifizierung von 27-Deoxyactein wird mit der HPLC-Methode 06 durchgeführt. Als Referenzstandard wird die Reinsubstanz 27-Deoxyactein eingesetzt in einer Reinheit von 95 %. Als interner Standard wird Galphimin B in einer Konzentration von 500 µg/L verwendet.

3.2.2.1. Identität

Die Bewertung der Identität des Analyten und die eindeutige Zuordnung der detektierten Signale von Analyt und internem Standard (ggf. Referenzstandards) erfolgen anhand der chromatographischen Ergebnisse, die mit der HPLC-Methode 06 ermittelt werden.

Angelehnt an das Identifizierungspunkte-System zum massenspektrometrischen Nachweis von Kontaminanten mit Hilfe von Screeningmethoden (Europäischen Kommission - 2002/657/EG) soll eine Identifizierung anhand verschiedener Detektionskriterien erfolgen. Darüber hinaus kann bei Verwendung eines qualifizierten Referenzstandards identischer chemischer Struktur wie der des Analyten auch ein Vergleich von Retentionszeiten zwischen Studien mit Probe und Standardlösung innerhalb einer chromatographischen Methode herangezogen werden.

Die Regeln für Identifizierungspunkte sind:

| analytisches Verfahren | erzielte Identifizierungspunkte (pro Ion) |
|--|---|
| Retentionszeitenvergleich | 0,5 |
| Niedrig-auflösende Massenspektrometrie LRMS | 1,0 |
| LRMS Vorläuferprodukte (precursor ion) | 1,0 |
| LRMS Übergangsprodukte (fragment ion) | 1,5 |
| Hoch-auflösende Massenspektrometrie HRMS | 2,0 |
| HRMS Vorläuferprodukte (precursor ion) | 2,0 |
| HRMS Übergangsprodukte (fragment ion) | 2,5 |

ERGEBNISSE

- (1) Maximal zwei Retentionszeitenvergleiche dürfen berücksichtigt werden
- (2) Jedes Ion darf nur einmal gezählt werden (innerhalb eines Messverfahrens).
- (3) Verschiedene Analyten können nur dann verwendet werden, um die Anzahl der Identifizierungspunkte zu erhöhen, wenn Derivate verschiedene Reagenzien erfordern.
- (4) Übergangsprodukte schließen sowohl Tochter- als auch Enkeltochter-Produkte ein.
- (5) Die relative Intensität der Vorläufer- bzw. Übergangsprodukte muss mindestens 10 % des höchsten Signals betragen

Zur positiven Identifizierung müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- a) Eine Gesamtanzahl von mindestens 5 Punkten muss erreicht werden.
- b) Wenn ein qualifizierter Referenzstandard identischer chemischer Struktur vorliegt, muss eine Gesamtanzahl von mindestens 2 Punkten erreicht werden.
- c) Wenn kein qualifizierter Referenzstandard vorliegt, muss eine Gesamtanzahl von 5 Punkten erreicht werden.
- d) Maximal 3 unterschiedliche analytische Verfahren/ Methoden dürfen kombiniert werden, um die geforderte Punktzahl zu erreichen (die Prüfmethode muss genutzt werden)

Für die Auswertung gilt:

| Analyseverfahren | Ermittelte Werte | Erzielte Identifizierungspunkte |
|---|---|---------------------------------|
| Retentionszeitenvergleich Probe | 2,05 (Standard) 2,05 (Probe) | 0,5 |
| Retentionszeitenvergleich Interner Standard | 2,47 (Standard) 2,47 (Probe) | 0,5 |
| HRMS ESI (+) | 661,3958 (Standard) 661,3977 (Probe) | 2 |
| HRMS Fragment Ionen | 683,3775 (Standard) 683,3799 (Probe) | 2,5 |
| Gesamtpunktzahl: | | 5,5 |

Aufgrund der Gesamtpunktzahl von 5,5 gilt die positive Identifizierung des Analyten 27-Deoxyactein als erfüllt.

3.2.2.2. Kalibriergerade

Für jeden Analyten soll eine eigene Kalibrierreihe angefertigt werden, die aus mindestens 6 Kalibrierkonzentrationen aufgebaut ist; die niedrigste Konzentration ist dabei der LLOQ (Lower Limit of Quantification) und die höchste der ULOQ (Upper Limit of Quantification). Neben den Standardlösungen sollen zum Vergleich eine Blankprobe und eine Nullprobe gemessen werden, wobei diese nicht bei Berechnungen berücksichtigt werden dürfen. Die Kalibrierstandards können in analytischen Replikaten gemessen werden.

Da bei massenspektrometrischer Analytik die Kalibrierreihe nicht immer einer linearen Funktion folgt, ist das Ziel, das einfachste mathematische Modell zu finden, welches den Zusammenhang zwischen Konzentration des Analyten sowie dem detektierten Signal beschreibt. In Anlehnung an die entsprechende FDA Guideline [66] muss die Verwendung von komplexen Modellen und oder Gewichtungen begründet werden. Für die Dokumentation müssen die Funktionsparameter und die zurückgerechneten Standardkonzentrationen sowie die gemittelten Genauigkeitswerte angegeben werden.

Innerhalb einer Validierung müssen mindestens 3 Kalibriergeraden erstellt werden, idealerweise erfolgt die Erstellung an unterschiedlichen Tagen.

75 % der zurückgerechneten Konzentrationen sollten innerhalb $\pm 15 \%$ ($\pm 20 \%$ bei LLOQ) des nominellen Konzentrationswertes liegen. Bei Verwendung analytischer Replikate müssen mindestens 50 % der Werte den oben genannten Kriterien entsprechen. Sollte ein Standard diesen Kriterien nicht entsprechen, wird die Kalibrierfunktion erneut ohne diesen Wert ausgewertet. Wenn alle Replikate von LLOQ oder ULOQ nicht den Vorgaben entsprechen, muss die Messung wiederholt werden bzw. die Methode angepasst werden.

ERGEBNISSE

Kalibrationsfunktion Tag 1:

| Sample Name | Actual Concentration | Area | IS Area | Retention Time | Calculated Concentration | Accuracy |
|-------------|----------------------|----------|----------|----------------|--------------------------|----------|
| CAL-1 | 5,51 | 7,47E+02 | 8,57E+04 | 2,05 | 5,27 | 95,55 |
| CAL-2 | 11,03 | 1,33E+03 | 8,39E+04 | 2,06 | 10,27 | 93,12 |
| CAL-3 | 22,39 | 2,91E+03 | 8,77E+04 | 2,05 | 22,13 | 98,82 |
| CAL-4 | 44,45 | 5,89E+03 | 8,22E+04 | 2,05 | 46,31 | 104,19 |
| CAL-5 | 89,23 | 1,29E+04 | 8,59E+04 | 2,06 | 89,44 | 100,23 |
| CAL-6 | 111,29 | 1,65E+04 | 8,61E+04 | 2,06 | 110,30 | 99,15 |
| CAL-7 | 222,91 | 4,23E+04 | 8,99E+04 | 2,05 | 223,00 | 100,05 |

Calibration for 27-DEA: $y = 3.23608e-6 x^2 + 0.00138 x + 8.58727e-4$ ($r = 0.99960$) (weighting: $1 / x^2$)

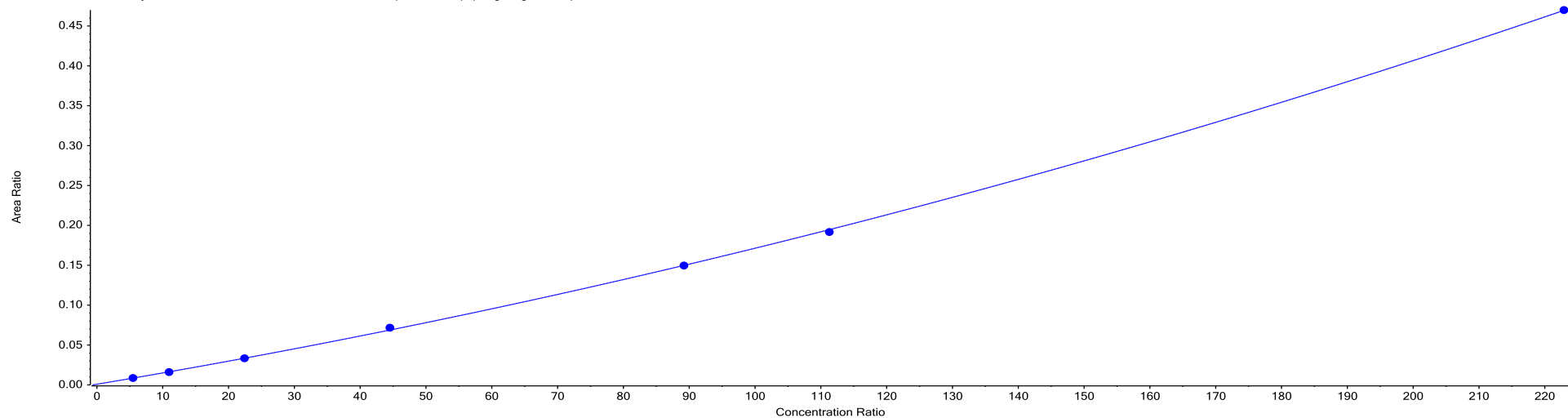


Abb. 45 Kalibrationskurve Validierungscharge V01

ERGEBNISSE

Kalibrationsfunktion Tag 2:

| Sample Name | Actual Concentration | Area | IS Area | Retention Time | Calculated Concentration | Accuracy |
|-------------|----------------------|----------|----------|----------------|--------------------------|----------|
| CAL2-1 | 5,51 | 7,14E+02 | 7,50E+04 | 2,11 | 5,46 | 99,15 |
| CAL2-2 | 11,03 | 1,54E+03 | 7,96E+04 | 2,1 | 11,41 | 103,46 |
| CAL2-3 | 22,39 | 3,00E+03 | 8,22E+04 | 2,11 | 21,67 | 96,78 |
| CAL2-4 | 44,45 | 6,24E+03 | 8,39E+04 | 2,1 | 43,47 | 97,79 |
| CAL2-5 | 89,23 | 1,31E+04 | 8,00E+04 | 2,11 | 91,46 | 102,5 |
| CAL2-6 | 111,29 | 1,56E+04 | 7,62E+04 | 2,11 | 112,40 | 101,04 |
| CAL2-7 | 222,91 | 3,76E+04 | 8,46E+04 | 2,11 | 221,10 | 99,21 |

Calibration for 27-DEA: $y = 1.74888e-6 x^2 + 0.00162 x + 6.27803e-4$ ($r = 0.99958$) (weighting: $1 / x^2$)

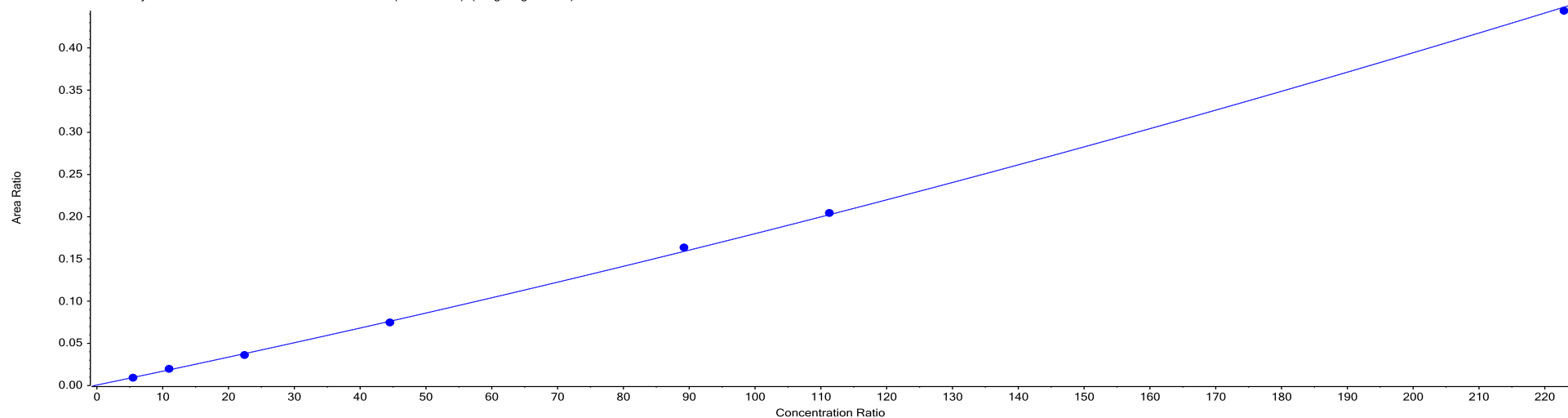


Abb. 46 Kalibrationskurve Validierungscharge V02

ERGEBNISSE

Kalibrationsfunktion Tag 3:

| Sample Name | Actual Concentration | Area | IS Area | Retention Time | Calculated Concentration | Accuracy |
|-------------|----------------------|----------|----------|----------------|--------------------------|----------|
| CAL-1 | 5,51 | 7,55E+02 | 8,02E+04 | 2,11 | 5,37 | 97,48 |
| CAL-2 | 11,03 | 1,51E+03 | 7,71E+04 | 2,11 | 11,82 | 107,14 |
| CAL-3 | 22,39 | 2,95E+03 | 8,30E+04 | 2,12 | 21,73 | 97,07 |
| CAL-4 | 44,45 | 5,91E+03 | 8,25E+04 | 2,11 | 42,86 | 96,43 |
| CAL-5 | 89,23 | 1,26E+04 | 7,85E+04 | 2,12 | 89,76 | 100,59 |
| CAL-6 | 111,29 | 1,68E+04 | 8,02E+04 | 2,12 | 113,10 | 101,59 |
| CAL-7 | 222,91 | 3,98E+04 | 8,26E+04 | 2,13 | 222,20 | 99,67 |

Calibration for 27-DEA: $y = 2.88676e-6 x^2 + 0.00152 x + 0.00117$ ($r = 0.99920$) (weighting: $1 / x^2$)

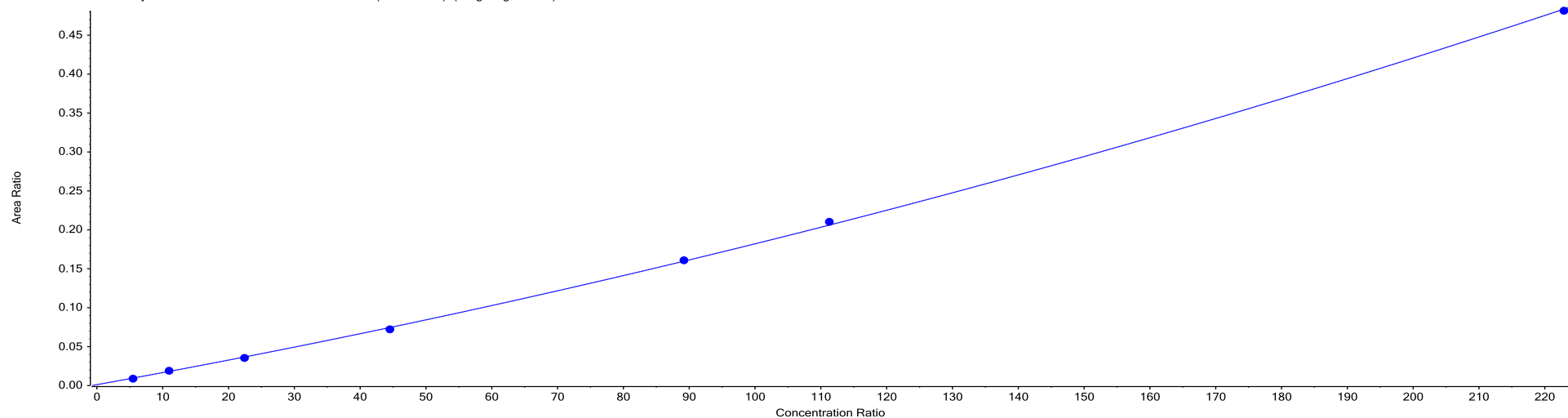


Abb. 47 Kalibrationskurve Validierungscharge V03

ERGEBNISSE

Kalibrationsfunktion Tag 4:

| Sample Name | Actual Concentration | Area | IS Area | Retention Time | Calculated Concentration | Accuracy |
|-------------|----------------------|----------|----------|----------------|--------------------------|----------|
| CAL-1 | 5,51 | 1,18E+03 | 1,37E+05 | 2,05 | 5,68 | 103,11 |
| CAL-2 | 11,03 | 2,18E+03 | 1,36E+05 | 2,05 | 10,69 | 96,88 |
| CAL-3 | 22,39 | 4,23E+03 | 1,38E+05 | 2,04 | 20,50 | 91,56 |
| CAL-4 | 44,45 | 9,25E+03 | 1,38E+05 | 2,05 | 43,92 | 98,81 |
| CAL-5 | 89,23 | 2,12E+04 | 1,39E+05 | 2,06 | 96,49 | 108,13 |
| CAL-6 | 111,29 | 2,62E+04 | 1,39E+05 | 2,05 | 117,20 | 105,35 |
| CAL-7 | 222,91 | 5,18E+04 | 1,40E+05 | 2,05 | 213,60 | 95,81 |

Calibration for 27-DEA: $y = 1.24781e-6 x^2 + 0.00146 x + 2.45497e-4$ ($r = 0.99729$) (weighting: $1 / x^2$)

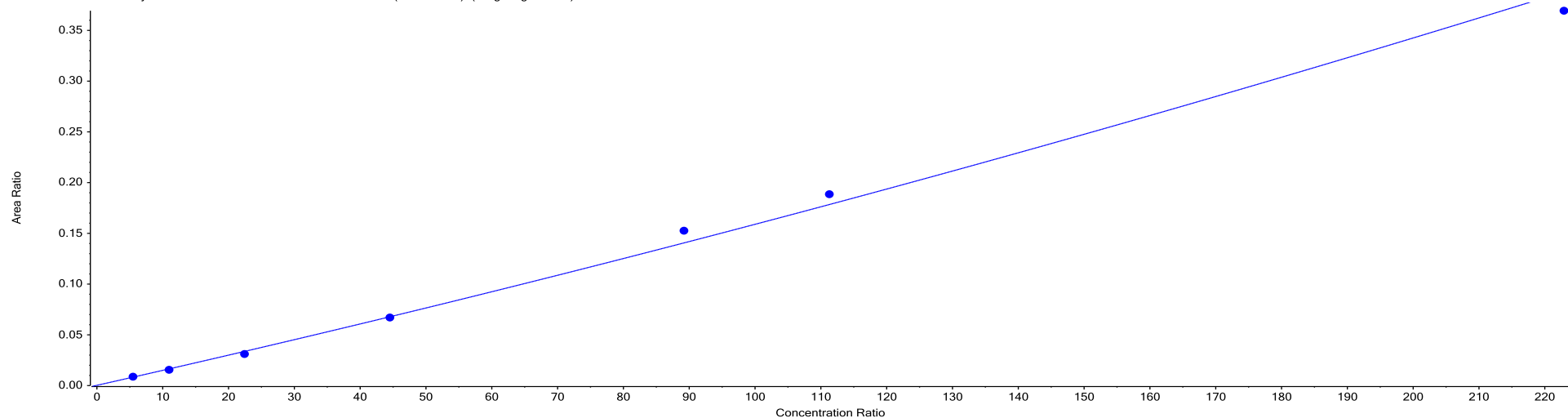


Abb. 48 Kalibrationskurve Validierungscharge V04

ERGEBNISSE

Ergebnis der Kalibration:

Die analytische Methode bietet unter Verwendung einer quadratischen Anpassungsfunktion mit einer quadratischen Gewichtung eine gute Regression und deckt einen Konzentrationsbereich von 5 – 220 µg/L ab. Alle gefundenen Korrelationskoeffizienten der vier Validierungschargen sind ≥ 0.997 (siehe Tab. 18).

In den Abb. 45, Abb. 46, Abb. 47 und Abb. 48 ist die Kalibrationsfunktion exemplarisch für alle Validierungschargen dargestellt. Die Chromatogramme des LLOQ und des ULOQ Standards sind in Abb. 49 dargestellt.

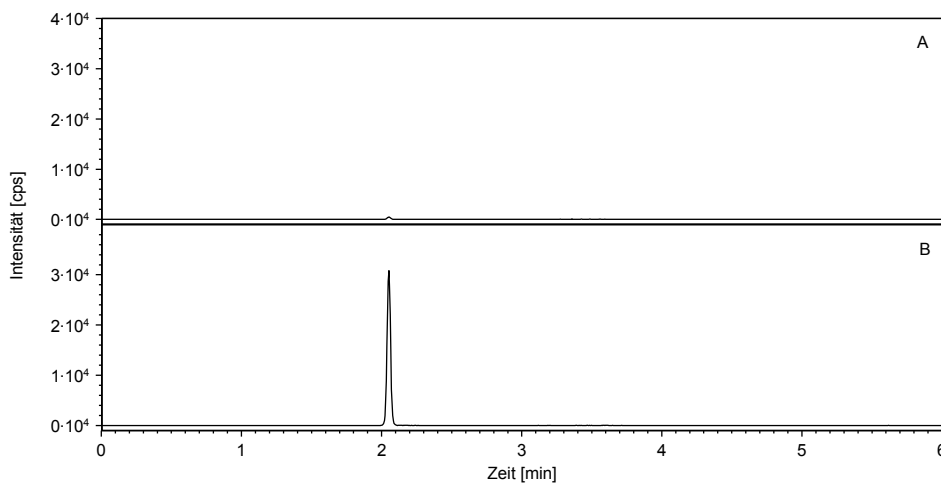


Abb. 49 XIC des LLOQ bei m/z 683,3780 $[M+Na]^+$ (A), XIC des ULOQ bei m/z 683,3780 $[M+Na]^+$ (B)

Tab. 18 Kalibrierfunktion und Regressionsparameter

| Validierungs-charge | a | b | c | r | Kalibrierbereich [µg/L] | Anzahl Standards | Gewichtung |
|---------------------|----------|---------|----------|--------|----------------------------|------------------|------------|
| V01 | 3,24E-06 | 0,00138 | 8,59E-04 | 0,9996 | 5-220 | 7 | $1/x^2$ |
| V02 | 1,75E-06 | 0,00162 | 6,28E-04 | 0,9996 | 5-221 | 7 | $1/x^2$ |
| V03 | 2,89E-06 | 0,00152 | 0,00117 | 0,9992 | 5-222 | 7 | $1/x^2$ |
| V04 | 1,25E-06 | 0,00146 | 2,45E-04 | 0,9973 | 5-223 | 7 | $1/x^2$ |

$y=ax^2+bx+c$, r = Korrelationskoeffizient

3.2.2.3. Verschleppung/ Carry-Over

Besonders bei der Anwendung hochsensitiver massenspektrometrischer Analytik kann es nach Injektion hochkonzentrierter Proben zu Verschleppungen im System kommen und somit zu einer Beeinflussung der nachfolgenden Proben. In der EMA Guideline [67] sind hierfür Grenzwerte für einen Double Blank, injiziert nach einem hochkonzentrierten Standard, von 20 % des LLOQ für den Analyten und 5 % für den internen Standard angegeben. Sollten trotz Optimierung der Methode diese Grenzwerte nicht eingehalten werden können, müssen Blankproben zwischen den Studien-Proben gemessen werden bzw. die Methode optimiert werden.

Für die Ermittlung der Verschleppung des Analyten sowie des internen Standards wird der ULOQ gemessen, gefolgt von der Messung eines Double Blank (CAL-X). Die Ergebnisse sind in Tab. 19 zusammengefasst. Abb. 50 zeigt ein exemplarisches Chromatogramm der Massenspur 683,3780 [M+Na]⁺ des ULOQ.

Tab. 19 Blank und Nullprobe, Verschleppungen:

| Validierungs-charge | Ratio (Analyt /IS) IS vs. LLOQ | IS Signal CAL-X vs. IS | Verschleppung Analyt | Verschleppung IS |
|---------------------|-----------------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|
| V01 | 3,2% | 0,0% | 5,3% | 0,0% |
| V02 | 4,1% | 0,1% | 3,3% | 0,0% |
| V03 | 1,8% | 0,0% | 6,8% | 0,1% |
| V04 | 3,6% | 0,0% | 2,9% | 0,0% |

Die Injektion eines Double Blank (CAL-X) nach der Messung des am höchsten konzentrierten Standards (ULOQ) zeigt, dass keine Verschleppungen durch den Analyten und den IS detektiert werden können, so dass eine Verschleppung und damit eine Verfälschung der Ergebnisse mit dieser Methode nicht zu erwarten ist (Abb. 50).

ERGEBNISSE

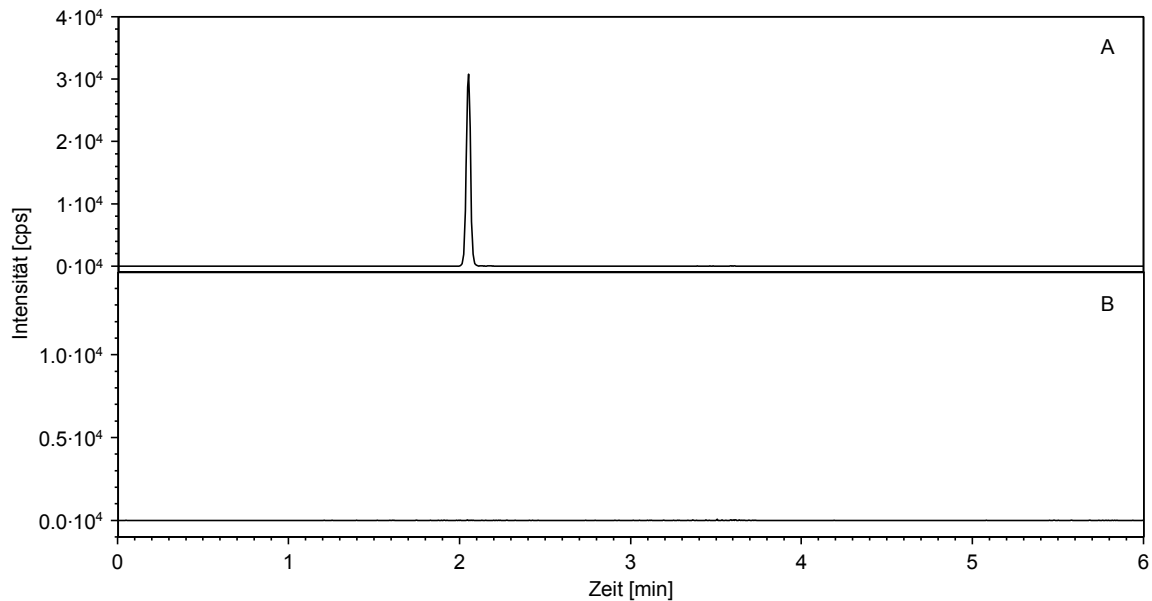


Abb. 50 XIC des ULOQ bei m/z 683,3780 $[M+Na]^+$ (A); XIC des nachfolgenden Double Blank bei m/z 683,3780 (B)

3.2.2.4. Genauigkeit

Die Genauigkeit einer Methode setzt sich aus Richtigkeit und Präzision zusammen und charakterisiert dementsprechend zufällige und systematische Fehler der analytischen Methodik.

Richtigkeit:

Die Richtigkeit einer analytischen Messung beschreibt die prozentuale Abweichung des gemessenen Wertes zum nominellen Konzentrationswert der Probe und ist somit ein Maß für den systematischen Fehler.

Zur Bestimmung wird eine Studien-Probe mit verschiedenen Konzentrationen Referenzstandard dotiert (Aufstockversuche) bzw. mit Matrix (Blank) verdünnt, so dass mindestens 5 Proben bei jeweils 3 Konzentrationen zwischen LLOQ und ULOQ resultieren (QC, Quality Control Proben). Die dafür verwendete Stocklösung des Referenzstandards ist dabei unabhängig von der Kalibrierreihe. Zielkonzentrationen sind der LLOQ (QC-A), ~ 50 % des Kalibrierbereichs (QC-B) und mindestens 75 % des ULOQ (QC-C).

Präzision:

Die Präzision beschreibt die Streuung der gemessenen Werte und ist somit ein Maß für den zufälligen Fehler. Die Bestimmung erfolgt unter Verwendung der Messungen für die Bestimmung der Richtigkeit.

ERGEBNISSE

Für die Wiederholpräzision (within-run) und die Vergleichspräzision (between-run) werden jeweils die Variationskoeffizienten (relative Standardabweichung) berechnet, wobei 15 % (20 % für LLOQ) nicht überschritten werden dürfen.

Zur Bestimmung der Instrumentenpräzision wird jeweils eine Probe jeder der 3 Konzentrationsstufen in 5-fach Bestimmung analysiert. Die Variationskoeffizienten für die Instrumentenpräzision sollte dabei 7,5 % (10 % für LLOQ) nicht überschreiten.

Die Ergebnisse werden in den nachstehenden Tabellen aufgeführt.

Tab. 20 Richtigkeit und Präzision der LLOQ-Proben

| Validierungscharge | Einheit | LLOQ-1 | LLOQ-2 | LLOQ-3 | LLOQ-4 | LLOQ-5 | LLOQ-6 |
|-------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Erwartete Konzentration | µg/L | 5,57 | | | | | |
| V01 | µg/L | 6,01 | 5,60 | 5,92 | 5,06 | 5,74 | 5,71 |
| V03 | µg/L | 5,69 | 5,04 | 5,63 | 5,13 | 5,69 | 6,08 |
| V04 | µg/L | 5,17 | 4,92 | 5,59 | 5,51 | 5,71 | 5,52 |
| Mittelwert | µg/L | 5,62 | 5,19 | 5,71 | 5,23 | 5,72 | 5,77 |

Tab. 21 Between-Run Analyse der LLOQ-Proben

| Mittelwert [µg/L] | Richtigkeit [%] | CV [%] | Richtigkeit gemittelt [%] | CV gemittelt [%] |
|-------------------|-----------------|--------|---------------------------|------------------|
| 5,62 | 100,9 | 7,5 | 99,5 | 4,59 |
| 5,19 | 93,1 | 7,0 | | |
| 5,71 | 102,6 | 3,2 | | |
| 5,23 | 93,9 | 4,5 | | |
| 5,72 | 102,6 | 0,4 | | |
| 5,77 | 103,6 | 5,0 | | |

ERGEBNISSE

Tab. 22 Within run Analyse der LLOQ-Proben

| Mittelwert [µg/L] | Richtigkeit [%] | CV [%] | Richtigkeit gemittelt [%] | CV gemittelt [%] |
|----------------------|--------------------|-----------|------------------------------|---------------------|
| 5,67 | 101,9 | 5,9 | 99,5 | 6,1 |
| 5,54 | 99,5 | 7,1 | | |
| 5,40 | 97,0 | 5,5 | | |

Tab. 23 Richtigkeit und Präzision der QC-A Proben

| Validierungscharge | Einheit | QC-A-1 | QC-A-2 | QC-A-3 | QC-A-4 | QC-A-5 |
|-------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Erwartete Konzentration | µg/L | 20,82 | | | | |
| V01 | µg/L | 17,51 | 18,04 | 17,99 | 18,71 | 18,80 |
| V03 | µg/L | 18,33 | 18,86 | 19,44 | 19,20 | 18,54 |
| V04 | µg/L | 20,14 | 20,71 | 21,34 | 21,08 | 20,37 |
| Mittelwert | µg/L | 18,66 | 19,20 | 19,59 | 19,66 | 19,24 |

Tab. 24 Between-Run Analyse der QC-A Proben

| Mittelwert [µg/L] | Richtigkeit [%] | CV [%] | Richtigkeit gemittelt [%] | CV gemittelt [%] |
|----------------------|--------------------|-----------|------------------------------|---------------------|
| 18,66 | 89,6 | 7,2 | 92,6 | 6,88 |
| 19,20 | 92,2 | 7,1 | | |
| 19,59 | 94,1 | 8,6 | | |
| 19,66 | 94,4 | 6,4 | | |
| 19,24 | 92,4 | 5,1 | | |

Tab. 25 Within-Run Analyse der QC-A Proben

| Mittelwert [µg/L] | Richtigkeit [%] | CV [%] | Richtigkeit gemittelt [%] | CV gemittelt [%] |
|----------------------|--------------------|-----------|------------------------------|---------------------|
| 18,21 | 87,5 | 3,0 | 92,6 | 2,6 |
| 18,87 | 90,7 | 2,4 | | |
| 20,73 | 99,6 | 2,4 | | |

ERGEBNISSE

Tab. 26 Richtigkeit und Präzision der QC-B Proben

| Validierungscharge | Einheit | QC-B-1 | QC-B-2 | QC-B-3 | QC-B-4 | QC-B-5 |
|-------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Erwartete Konzentration | µg/L | 83,28 | | | | |
| V01 | µg/L | 81,91 | 76,66 | 79,42 | 82,43 | 81,27 |
| V03 | µg/L | 86,18 | 82,27 | 82,07 | 85,34 | 85,43 |
| V04 | µg/L | 76,58 | 76,87 | 77,01 | 75,34 | 73,90 |
| Mittelwert | µg/L | 81,56 | 78,60 | 79,50 | 81,04 | 80,20 |

Tab. 27 Between-Run Analyse der QC-B Proben

| Mittelwert [µg/L] | Richtigkeit [%] | CV [%] | Richtigkeit gemittelt [%] | CV gemittelt [%] |
|----------------------|--------------------|-----------|------------------------------|---------------------|
| 81,56 | 97,9 | 5,9 | 96,3 | 5,35 |
| 78,60 | 94,4 | 4,0 | | |
| 79,50 | 95,5 | 3,2 | | |
| 81,04 | 97,3 | 6,3 | | |
| 80,20 | 96,3 | 7,3 | | |

Tab. 28 Within Run Analyse der QC-B Proben

| Mittelwert [µg/L] | Richtigkeit [%] | CV [%] | Richtigkeit gemittelt [%] | CV gemittelt [%] |
|----------------------|--------------------|-----------|------------------------------|---------------------|
| 80,34 | 96,5 | 2,9 | 96,3 | 2,3 |
| 84,26 | 101,2 | 2,3 | | |
| 75,94 | 91,2 | 1,7 | | |

ERGEBNISSE

Tab. 29 Richtigkeit und Präzision der QC-C Proben

| Validierungscharge | Einheit | QC-C-1 | QC-C-2 | QC-C-3 | QC-C-4 | QC-C-5 |
|-------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Erwartete Konzentration | µg/L | 208,20 | | | | |
| V01 | µg/L | 192,90 | 207,60 | 191,80 | 198,10 | 206,80 |
| V03 | µg/L | 220,60 | 221,20 | 222,30 | 213,50 | 210,90 |
| V04 | µg/L | 203,60 | 208,30 | 207,90 | 212,60 | 203,90 |
| Mittelwert | µg/L | 205,70 | 212,37 | 207,33 | 208,07 | 207,20 |

Tab. 30 Between-Run Analyse der QC-C Proben

| Mittelwert [µg/L] | Richtigkeit [%] | CV [%] | Richtigkeit gemittelt [%] | CV gemittelt [%] |
|----------------------|--------------------|-----------|------------------------------|---------------------|
| 205,70 | 98,8 | 6,8 | 100,0 | 4,72 |
| 212,37 | 102,0 | 3,6 | | |
| 207,33 | 99,6 | 7,4 | | |
| 208,07 | 99,9 | 4,2 | | |
| 207,20 | 99,5 | 1,7 | | |

Tab. 31 Within Run Analyse der QC-C Proben

| Mittelwert [µg/L] | Richtigkeit [%] | CV [%] | Richtigkeit gemittelt [%] | CV gemittelt [%] |
|----------------------|--------------------|-----------|------------------------------|---------------------|
| 199,44 | 95,8 | 3,8 | 100,0 | 2,6 |
| 217,70 | 104,6 | 2,4 | | |
| 207,26 | 99,5 | 1,8 | | |

ERGEBNISSE

Zeitlicher Trend

Am Ende eines langen Messlaufes werden nochmals die QC-Proben gemessen und darüber die zeitliche Messstabilität bewertet.

Für die Auswertungen dürfen die Abweichungen der gemittelten Werte zu den nominellen Werten 15 % (20 % für LLOQ) nicht überschreiten. In Tab. 32 sind alle Werte der zeitlichen Messstabilität aufgeführt, alle Ergebnisse liegen innerhalb der Kriterien von $\pm 15\%$. Die Methode ist damit über die Zeit als valide zu betrachten.

Tab. 32 Auswertung der zeitlichen Messstabilität

Richtigkeit QC-Proben zeitlicher Trend

| | | | | |
|----------------------------|-----------------|-------|-------|--------|
| erwartete Konzentration | $\mu\text{g/L}$ | 20 | 80 | 200 |
| berechnete Konzentrationen | $\mu\text{g/L}$ | 20,82 | 83,28 | 208,20 |
| Validierungscharge | | TOT-A | TOT-B | TOT-C |
| V01 | $\mu\text{g/L}$ | 21,15 | 78,23 | 191,40 |
| V02 | $\mu\text{g/L}$ | 19,30 | 77,29 | 206,20 |
| V03 | $\mu\text{g/L}$ | 19,79 | 73,87 | 203,50 |
| Richtigkeit | % | 96 | 92 | 96 |

3.2.2.5. Selektivität

Die Selektivität einer Methode ist die Fähigkeit zwischen einem gemessenen Analyten und anderen Inhaltstoffen bzw. der Matrix zu unterscheiden.

Angelehnt an die EMA Guideline sollen hierfür Blankmatrices mit der Prüfmethode verglichen werden, wobei keine Beeinflussung gegeben ist, wenn das Signal weniger als 20 % des LLOQ (lower limit of quantification) für den Analyten und 5 % für das Signal des internen Standards ist. Sofern verfügbar, sollen je 6 individuelle Blankmatrices getestet werden.

Verwendete Blankmatrices:

- Für die Analytik verwendetes Lösungsmittel Methanol (SEL-01)
- FaSSIF/MeOH 40 % (V/V) 1:1 verdünnt (SEL-02)
- HBSS/MeOH 40 % (V/V) 1:1 verdünnt (SEL-03)
- FaSSIF/H₂O 1:1 verdünnt (SEL-04)
- HBSS/H₂O 1:1 verdünnt (SEL-05)
- FaSSIF/MeOH 40 % (V/V) 1:1 verdünnt (SEL-06)

In den Nullproben (SEL-0x) darf kein Signal des Analyten 27-Deoxyactein und in den Blankproben (SEL-Xx) kein Signal des internen Standard (IS) detektiert werden. In den SEL-LLOQx Proben wird der Analyt im Bereich des LLOQ in die Matrices gespikt, wobei keine Beeinflussung der Matrix auf das Signal des Analyten gegeben ist, wenn die Wiederfindung nicht mehr oder weniger als 20 % des Kalibrierstandards abweicht.

Die Ergebnisse sind in den nachstehenden Tabellen dargestellt.

ERGEBNISSE

Tab. 33 Selektivität der Matrices auf den Analyten

| Probe | Fläche Analyt [counts] | Fläche IS [counts] | Flächenverhältnis Analyt/ IS | Flächenverhältnis Analyt/ IS vs. CAL-1 | Flächenverhältnis Analyt/ IS SEL Probe vs. CAL-1 |
|--------|------------------------|--------------------|------------------------------|--|--|
| SEL-01 | 23,19 | 84640,00 | 0,00 | 0,00 | 0% |
| SEL-02 | 44,26 | 87540,00 | 0,00 | 0,00 | 0% |
| SEL-03 | 17,59 | 83080,00 | 0,00 | 0,00 | 0% |
| SEL-04 | 13,05 | 84400,00 | 0,00 | 0,00 | 0% |
| SEL-05 | 13,69 | 92170,00 | 0,00 | 0,00 | 0% |
| SEL-06 | 11,37 | 91440,00 | 0,00 | 0,00 | 0% |

Tab. 34 Selektivität der Matrices auf den internen Standard IS

| Probe | Fläche Analyt [counts] | Fläche IS [counts] | Flächenverhältnis Analyt/ IS | Flächenverhältnis Analyt/ IS vs. CAL-1 | IS Signal SEL-X Probe vs. SEL-O Probe |
|--------|------------------------|--------------------|------------------------------|--|---------------------------------------|
| SEL-X1 | 29,73 | 47,23 | 0,63 | 0,00 | 0% |
| SEL-X2 | 13,07 | 15,53 | 0,84 | 0,00 | 0% |
| SEL-X3 | 8,68 | 31,70 | 0,27 | 0,00 | 0% |
| SEL-X4 | 5,87 | 60,72 | 0,10 | 0,00 | 0% |
| SEL-X5 | 1,74 | 39,17 | 0,04 | 0,00 | 0% |
| SEL-X6 | 8,33 | 28,40 | 0,29 | 0,00 | 0% |

ERGEBNISSE

Tab. 35 Wiederfindung des Analyten in den unterschiedlichen Matrices

| Probe | Fläche Analyt [counts] | calculated concentration SEL-LLOQ | Flächenverhältnis Analyt/ IS | Flächenverhältnis Analyt/ CAL-3 | Recovery SEL-LLOQ vs. CAL-3 |
|--------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| SEL-01-LLOQ1 | 2891,00 | 21,75 | | 0,99 | 97,71 |
| SEL-01-LLOQ2 | 2881,00 | 21,58 | | 0,99 | 96,95 |
| SEL-01-LLOQ3 | 2679,00 | 19,92 | | 0,92 | 89,49 |
| SEL-02-LLOQ1 | 2993,00 | 22,31 | | 1,03 | 100,22 |
| SEL-02-LLOQ2 | 3085,00 | 23,18 | | 1,06 | 104,13 |
| SEL-02-LLOQ3 | 2886,00 | 22,70 | | 0,99 | 101,98 |
| SEL-03-LLOQ1 | 3084,00 | 23,82 | | 1,06 | 107,01 |
| SEL-03-LLOQ2 | 2846,00 | 21,46 | | 0,98 | 96,41 |
| SEL-03-LLOQ3 | 2927,00 | 22,55 | | 1,01 | 101,30 |
| SEL-04-LLOQ1 | 2745,00 | 20,78 | | 0,94 | 93,35 |
| SEL-04-LLOQ2 | 2647,00 | 19,34 | | 0,91 | 86,88 |
| SEL-04-LLOQ3 | 2869,00 | 21,03 | | 0,99 | 94,47 |
| SEL-05-LLOQ1 | 3089,00 | 22,74 | | 1,06 | 102,16 |
| SEL-05-LLOQ2 | 3046,00 | 22,62 | | 1,05 | 101,62 |
| SEL-05-LLOQ3 | 3020,00 | 23,24 | | 1,04 | 104,40 |
| SEL-06-LLOQ1 | 3416,00 | 24,54 | | 1,17 | 110,24 |
| SEL-06-LLOQ2 | 3241,00 | 23,72 | | 1,11 | 106,56 |
| SEL-06-LLOQ3 | 3254,00 | 24,61 | | 1,12 | 110,56 |

ERGEBNISSE

3.2.2.6. Wiederfindung

Um die Wiederfindung des Analyten 27-Deoxyactein zu bestimmen, wird die Stammlösung aus den Genauigkeitsversuchen noch einmal separat verdünnt. Aus dieser Stammlösung werden für die Wiederfindung 3 unterschiedliche Verdünnungen hergestellt, die den Verdünnungen der QC-A, QC-B und QC-C Proben entsprechen. Die Samples werden jeweils in einer Doppelinjektion vermessen und gegen die Mittelwerte aus den Richtigkeitsmessungen ausgewertet. Die Recovery Messungen werden bei jeder Validierungscharge durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 36 - Tab. 39 aufgeführt. Die Kriterien für die Wiederfindung wurden auf $\pm 15\%$ festgelegt. Alle gemessenen Werte der Validierungschargen entsprechen diesen Kriterien.

Tab. 36 Ergebnisse der Wiederfindungsanalyse Validierungscharge V01

| Validierungscharge V01 | Einheit | REC-01 | REC-02 | REC-03 |
|-------------------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| Injektion 1 | $\mu\text{g/L}$ | 1,77E+01 | 7,85E+01 | 1,94E+02 |
| Injektion 2 | $\mu\text{g/L}$ | 2,05E+01 | 7,83E+01 | 1,91E+02 |
| Mittelwert | $\mu\text{g/L}$ | 1,91E+01 | 7,84E+01 | 1,92E+02 |
| Mittelwerte QC-Proben | $\mu\text{g/L}$ | 1,93E+01 | 8,02E+01 | 2,08E+02 |
| Recovery | % | 99,17 | 97,74 | 92,37 |

Tab. 37 Ergebnisse der Wiederfindungsanalyse Validierungscharge V02

| Validierungscharge V02 | Einheit | REC-01 | REC-02 | REC-03 |
|-------------------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| Injektion 1 | $\mu\text{g/L}$ | 1,56E+01 | 7,36E+01 | 1,98E+02 |
| Injektion 2 | $\mu\text{g/L}$ | 1,82E+01 | 7,34E+01 | 1,95E+02 |
| Mittelwert | $\mu\text{g/L}$ | 1,69E+01 | 7,35E+01 | 1,96E+02 |
| Mittelwerte QC-Proben | $\mu\text{g/L}$ | 1,93E+01 | 8,02E+01 | 2,08E+02 |
| Recovery | % | 87,62 | 91,66 | 94,39 |

ERGEBNISSE

Tab. 38 Ergebnisse der Wiederfindungsanalyse Validierungscharge V03

| Validierungscharge V03 | Einheit | REC-01 | REC-02 | REC-03 |
|------------------------|---------|----------|----------|----------|
| Injektion 1 | µg/L | 1,61E+01 | 7,38E+01 | 1,88E+02 |
| Injektion 2 | µg/L | 1,87E+01 | 7,37E+01 | 1,86E+02 |
| Mittelwert | µg/L | 1,74E+01 | 7,38E+01 | 1,87E+02 |
| Mittelwerte QC-Proben | µg/L | 1,93E+01 | 8,02E+01 | 2,08E+02 |
| Recovery | % | 90,14 | 91,99 | 89,77 |

Tab. 39 Ergebnisse der Wiederfindungsanalyse Validierungscharge V04

| Validierungscharge V04 | Einheit | REC-01 | REC-02 | REC-03 |
|------------------------|---------|----------|----------|----------|
| Injektion 1 | µg/L | 1,76E+01 | 8,24E+01 | 2,24E+02 |
| Injektion 2 | µg/L | 2,04E+01 | 8,22E+01 | 2,20E+02 |
| Mittelwert | µg/L | 1,90E+01 | 8,23E+01 | 2,22E+02 |
| Mittelwerte QC-Proben | µg/L | 1,93E+01 | 8,02E+01 | 2,08E+02 |
| Recovery | % | 98,52 | 102,64 | 106,61 |

3.2.2.7. Matrix Effekte

Massenspektrometrische Messverfahren sind sehr stark von der jeweiligen Matrix abhängig, in der sich der Analyt befindet, da dessen Ionisierung durch alle Begleitstoffe beeinflusst wird. Daher ist es zum einen wichtig, eine möglichst konstante Zusammensetzung der Proben zu gewährleisten, und zum anderen, die Matrixeffekte im Rahmen der Validierung systematisch zu untersuchen.

Die Matrixeffekte können vernachlässigt werden, wenn in unmittelbarer Nähe des Peaks ($\pm 3 \times$ Peakbreite auf 10 % der Peakhöhe) die Ionisierung des Analyten weniger als 10 % variiert. Ansonsten muss sichergestellt werden, dass Matrixeffekte keine Beeinflussung des Analyten der Probe bewirken bzw. es muss die Methode optimiert werden.

Für die Proben wird die Analyt-Stammlösung in den Bereich des LLOQ (MT-A) und des ULOQ (MT-C) mit den jeweiligen Matrices (siehe 3.2.2.5 Selektivität) verdünnt und gegen die QC-A und QC-C Probe untersucht.

ERGEBNISSE

Tab. 40 Ergebnisse der Matrix Effekte auf die Genauigkeit der Messmethode

| Validierungscharge | Einheit | MT-A | Recovery | MT-C | Recovery |
|-----------------------|---------|-------|----------|--------|----------|
| Mittelwerte QC-Proben | µg/L | 19,27 | % | 208,13 | % |
| V01 | µg/L | 19,93 | 103,4 | 197,70 | 95,0 |
| V02 | µg/L | 19,81 | 102,8 | 196,60 | 94,5 |
| V03 | µg/L | 18,77 | 97,4 | 207,60 | 99,7 |
| V04 | µg/L | 18,43 | 95,6 | 201,40 | 96,8 |
| V05 | µg/L | 18,18 | 94,3 | 204,60 | 98,3 |
| V06 | µg/L | 19,60 | 101,7 | 199,50 | 95,9 |

3.2.3. Zytotoxizität

Um die Zelltoxizität des Gesamtextraktes auf die Caco-2 Zelllinie zu untersuchen, wurde ein Vorversuch mit 3 verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Aus den Löslichkeitsversuchen ist bereits bekannt, dass bis zu einer Konzentration von 2 g/L die zu bestimmende Substanz 27-Deoxyactein komplett gelöst im Transportmedium vorliegt. Für die Toxizitätsversuche werden nun 3 Lösungen mit Gehalten von 200 mg/L, 500 mg/L und 1000 mg/L hergestellt und der TEER-Wert nach 180 min Testphase bestimmt (Tab. 41). Zusätzlich wird die Membran aus den Transwell Platten geschnitten und die Zellschicht mittels Mikroskop auf Beschädigungen untersucht (Abb. 51, Abb. 52, Abb. 53).

Tab. 41 Ermittlung des Teer-Wertes

| Sample | Anfang | Ende |
|---------|--------|------|
| 0,2 g/L | 277 | 291 |
| 0,5 g/L | 277 | 283 |
| 1 g/L | 276 | 282 |

Die Ergebnisse zeigten keinerlei toxische Wirkung von *Actaea racemosa* Spezial Extrakt C001 auf die Caco-2 Zellen über einen Zeitraum von 180 min im gewählten Konzentrationsmaximum von 1 g/L.

ERGEBNISSE

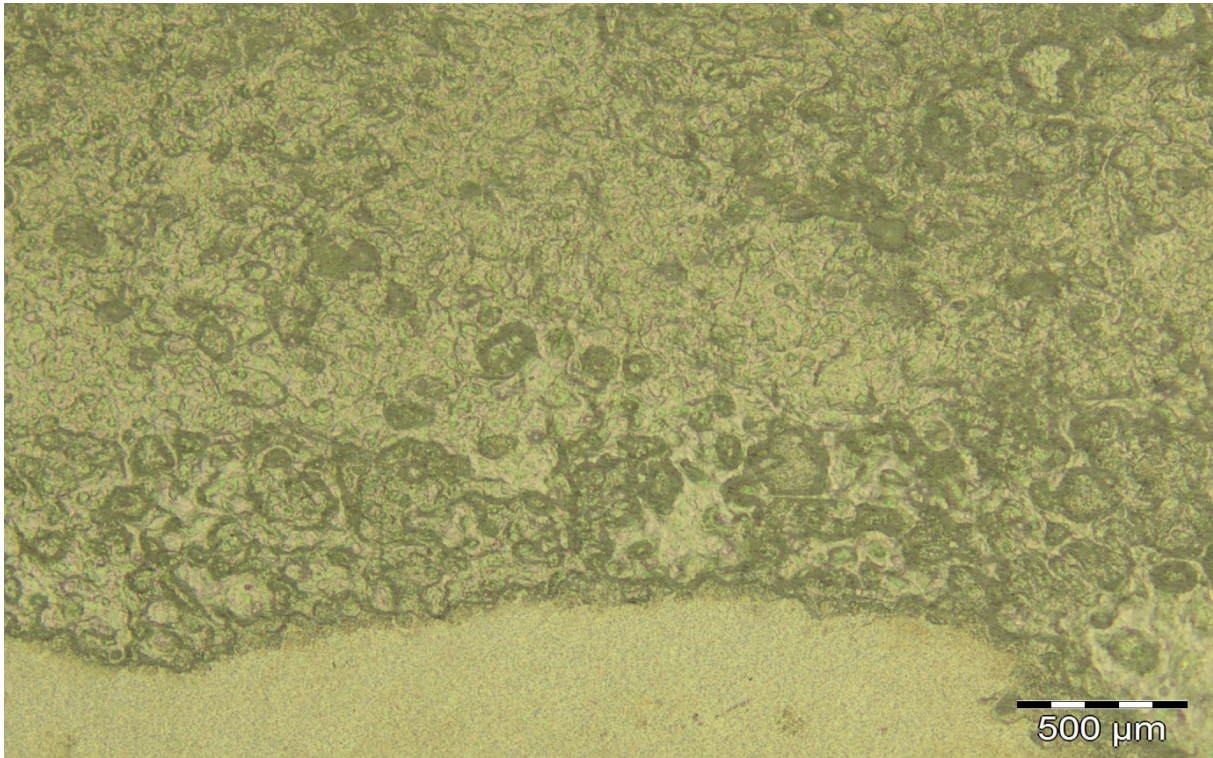


Abb. 51 Aufnahme der Monolayerschicht am Ende des Transportversuches mit 0.2 g/L C001 in FaSSIF

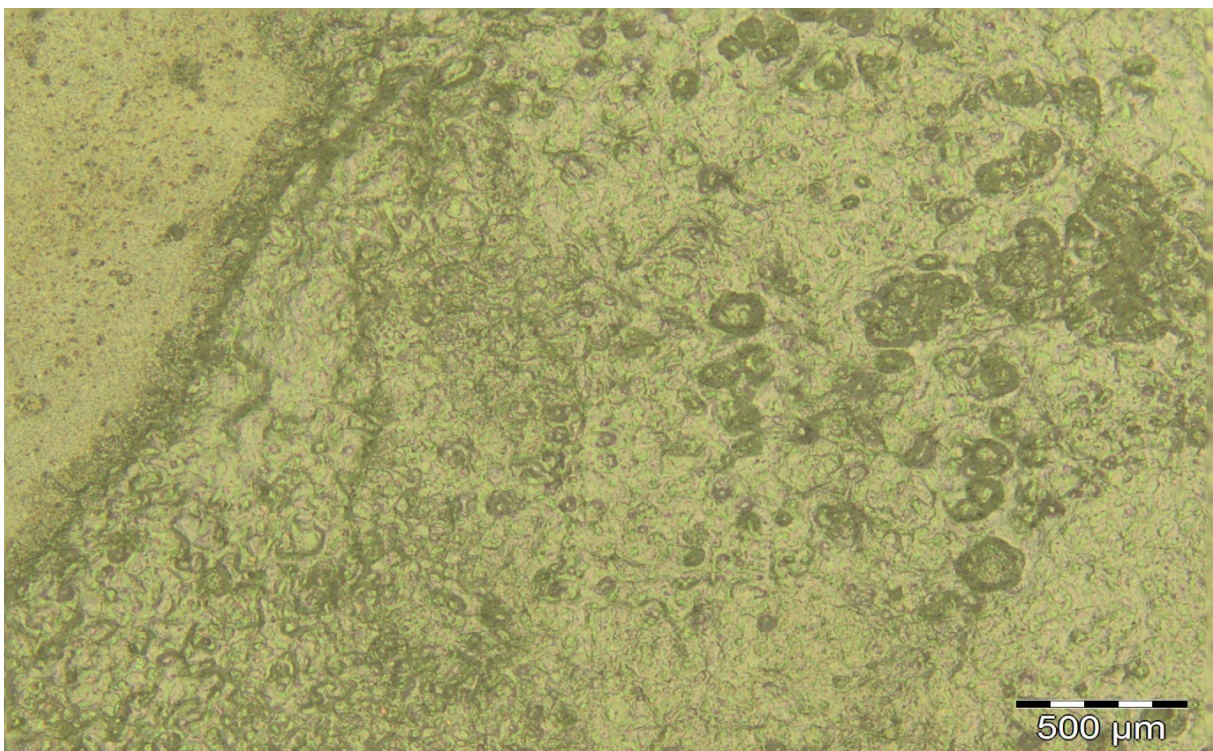


Abb. 52 Aufnahme der Monolayerschicht am Ende des Transportversuches mit 0.5 g/L C001 in FaSSIF

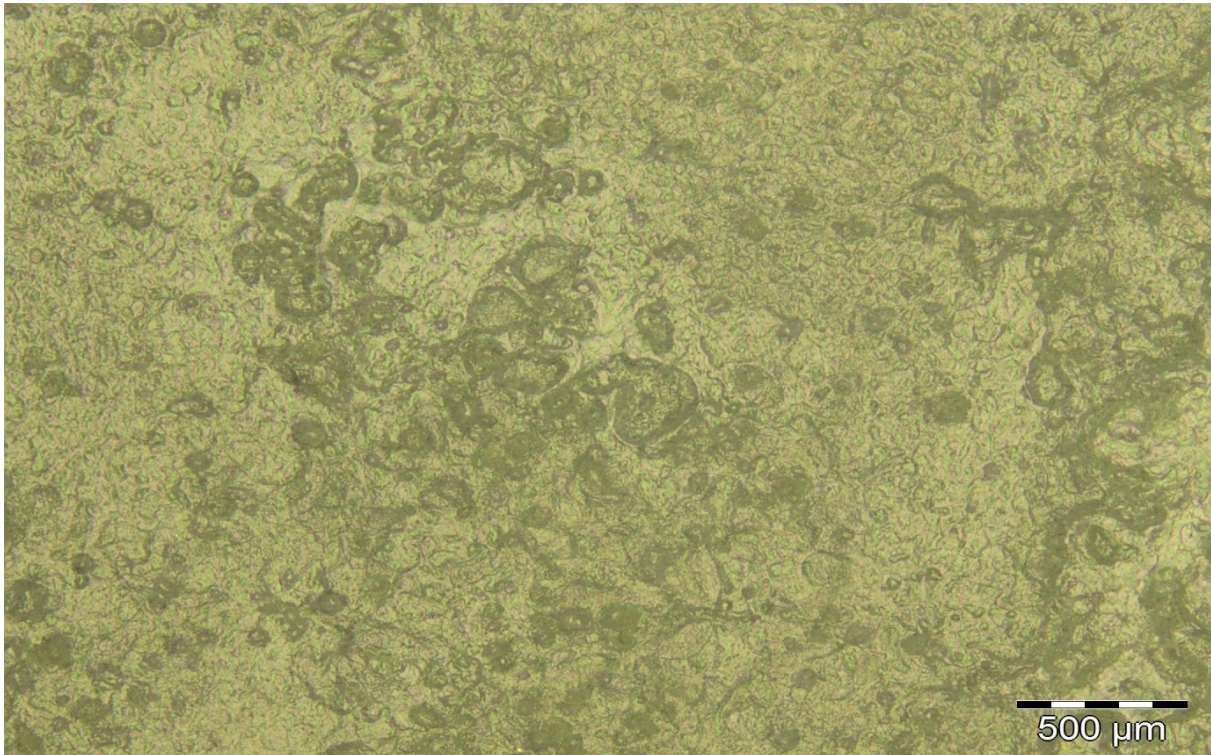


Abb. 53 Aufnahme der Monolayerschicht am Ende des Transportversuches mit 1 g/L C001 in FaSSIF

3.2.4. Integrität der Zellpassage

Die Ergebnisse der Positiv und Negativ Kontrolle zur Eignung der Zellpassage wurden vom Zentrallabor Deutscher Apotheker freundlicherweise zur Verfügung gestellt und sollen der Vollständigkeit kurz mit aufgeführt werden:

Papp-Wert Propranolol (Positiv-Kontrolle):

- $43,57 * e^{-6} \text{ cm/ s}$

Papp-Wert FITC-Dextran (Negativ-Kontrolle)

- $1,43 * e^{-6} \text{ cm/ s}$

Als weiterer Eignungstest wird vor den Transportversuchen der TEER Wert gemessen. Alle Werte lagen hier über dem geforderten Wert von $250 \Omega^* \text{ cm}^2$.

3.2.5. Anpassung des Caco-2 Modells

Den Triterpenglycosiden wird eine gewisse Affinität zur Plasmaproteinbindung zugeschrieben [68]. In vielen Fällen werden bestimmte Adjuvantien den Transportlösungen zugegeben, um einem adsorptiven Verhalten von Substanzen an Oberflächen entgegenzuwirken und die Substanzen in Lösung zu halten. Da die lösungsvermittelnden Eigenschaften der Intestinalflüssigkeit vor allem auf Mischmizellen aus Gallensalzen und Lecithinen beruht, wurde das Konzept des modified FaSSIF etabliert, das auch über längere Untersuchungszeiträume keine stark zellschädigenden Auswirkungen aufweist [69]. Hierzu wurden die mizellbildenden Substanzen Lecithin und Na-Taurocholat direkt in das übliche Transportmedium wie zum Beispiel HBSS-Puffer (+10 mM HEPES, pH 6,5) gegeben. Zudem wird durch die Zugabe von Hilfsstoffen ein Konzentrationsgradient erreicht (sog. „sink conditions“, von apikal nach basolateral), welcher als treibende Kraft für den Transport von Substanzen notwendig ist [70, 71].

Aufgrund der Tatsache, dass die basolaterale Transportlösung einen 4 prozentigen Zusatz von bovine serum albumin (BSA) vorsieht, sollte hier ein Testversuch durchgeführt werden, der die Unbedenklichkeit von BSA in dem Testsystem bestätigt, da Triterpenglycoside eine starke Plasmaproteinbindungsaffinität aufweisen und dadurch analytisch nicht mehr detektierbar sind.

Ein Transportversuch von A → B, in dem als basolaterales Medium HBSS Puffer mit 4 prozentigem Zusatz von BSA und als Vergleich dazu Puffer ohne Zusatz von BSA eingesetzt wird, zeigte, dass durch BSA die Massenbilanz und damit die Wiederfindung der Substanz zur Ausgangslösung stark abnimmt (siehe Abb. 54 und Abb. 55).

Durch den Zusatz von BSA werden 75 % des 27-Deoxyactein an Albumin gebunden und können nicht mehr detektiert und damit quantifiziert werden. Wird das Adjuvant dem System nicht zugesetzt, werden 96 % bzw. 92 % des 27-Deoxyacteins analytisch in den Proben wiedergefunden (Abb. 55). Da ebenfalls eine gute Verteilung des Analyten in den Kompartimenten gefunden wurde, kann davon ausgegangen werden, dass auch ohne Zusatz des Adjuvant, „sink conditions“ vorliegen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird auf den Zusatz von BSA in der Studie verzichtet.

Transport A → B mit Zusatz von 4 % BSA

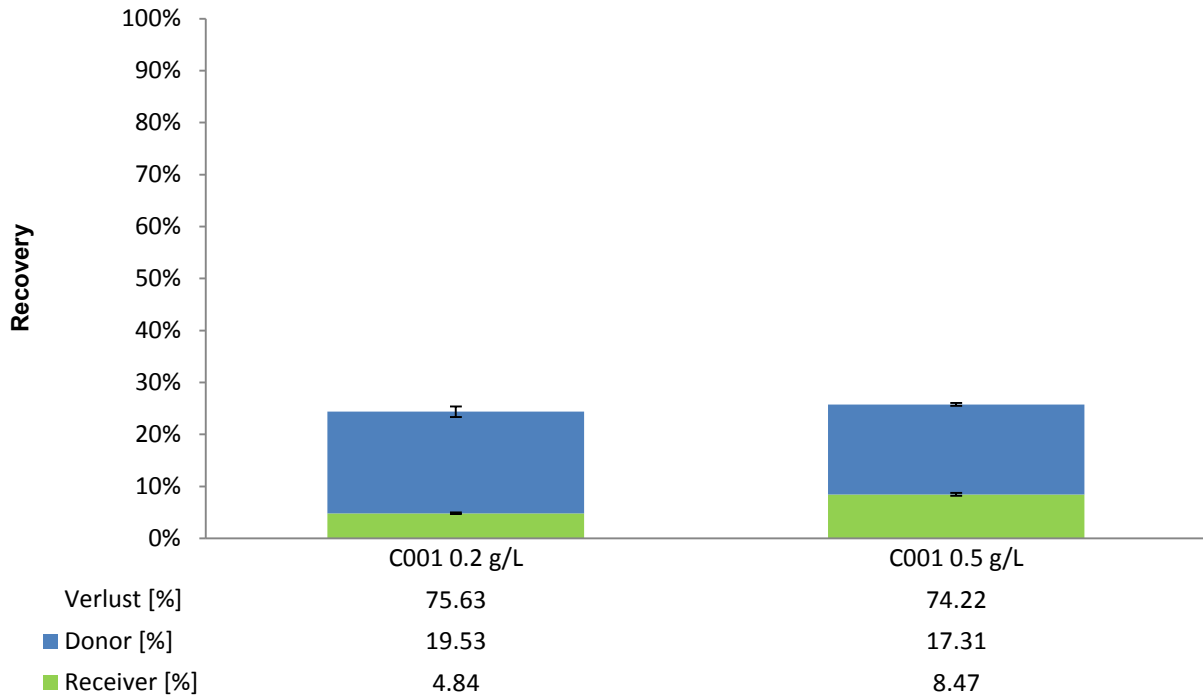


Abb. 54 Transportversuche mit Zusatz von 4 % BSA basolateral

Transport A → B ohne Zusatz von 4 % BSA

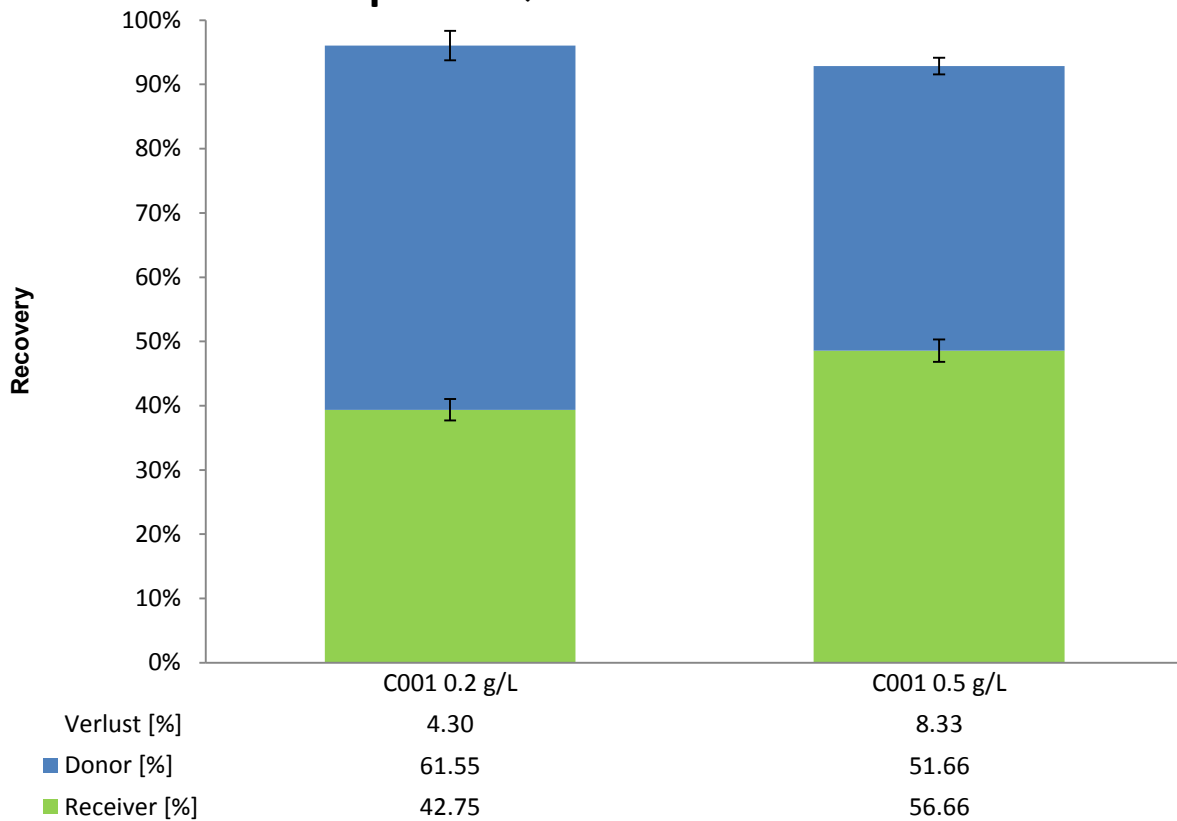


Abb. 55 Transportversuch ohne Zusatz von 4 % BSA basolateral

3.2.6. Permeabilität 27-Deoxyactein

In dem finalen Permeabilitätsassay wurde die Verteilung von 27-Deoxyactein im Donor- und Akzeptor-Kompartiment mittels der validierten HPLC-Methode 06 quantifiziert. Als Untersuchungslösungen werden die beiden Spezialextrakte aus *A. racemosa* BNO 1055 C001 und C005 verwendet (siehe Kapitel B.6.2.2.).

Die Transporte von A → B spiegeln die Aufnahme von 27-Deoxyactein nach oraler Einnahme wieder, während der Transport von B → A den Rücktransport und damit den Efflux aus der Lipidmembran in das äußere Kompartiment, das Darmlumen, aufzeigen soll.

Ein Papp-Wert von $10,4 \times e^{-6}$ wurde für 27-Deoxyactein in C001 beim Transport von A → B ermittelt. Dabei wurde von der Ausgangskonzentration von 1860.07 µg/L 27-Deoxyactein für C001 41.07 % im Akzeptor-Kompartiment und 43.61 % im Donor-Kompartiment wiedergefunden. Der Verlust von 15.32 % ist mit Adsorption der Substanz an den Transwell Wänden zu erklären. Intrazellulär konnte über dem LLOQ die Substanz nicht quantifiziert werden. In C005 liegt die Ausgangskonzentration von 27-Deoxyactein bei 1538.68 µg/L. Im Akzeptor-Kompartiment wurden hier 36.45 % und im Donor-Kompartiment 40.86 % wiedergefunden bei einem Verlust von 22.69 %. Der Papp-Wert von 27-Deoxyactein in C005 wurde auf einen Wert von $9.20 \times e^{-6}$ errechnet. Die Ergebnisse der A → B Transporte sind in Abb. 57 grafisch dargestellt.

In Abb. 58 werden die Ergebnisse der Efflux Transporte von B → A gezeigt. Im Akzeptor Kompartiment konnten bei C001 23.03 %, bei C005 28.1 % wiedergefunden werden. Im Donor Kompartiment wurden 68.06 % bei C001 und 70.64 % bei C005 wiedergefunden. Die Verluste beliefen sich hierbei auf 8.9 % bzw. 1.3 %. Bei C001 wurde ein Papp-Wert von $17.4 \times e^{-6}$ und bei C005 von $21.3 \times e^{-6}$ berechnet.

Um den vorliegenden Transportmechanismus (Abb. 56) zu erklären, wird die Efflux-Ratio nach der Formel in Kap. B.6.2.8 berechnet (Tab. 42). Für 27-Deoxyactein wurde dabei eine Efflux-Ratio von 2.0 ermittelt, was Rückschlüsse auf eine aktive Sekretion der Substanz schließen lässt.

Tab. 42 Efflux Ratio, ermittelt aus den Papp-Werten, von C001 und C005

| | Efflux Ratio |
|------|--------------|
| C001 | 1,68 |
| C005 | 2,31 |
| | 2,00 |

ERGEBNISSE

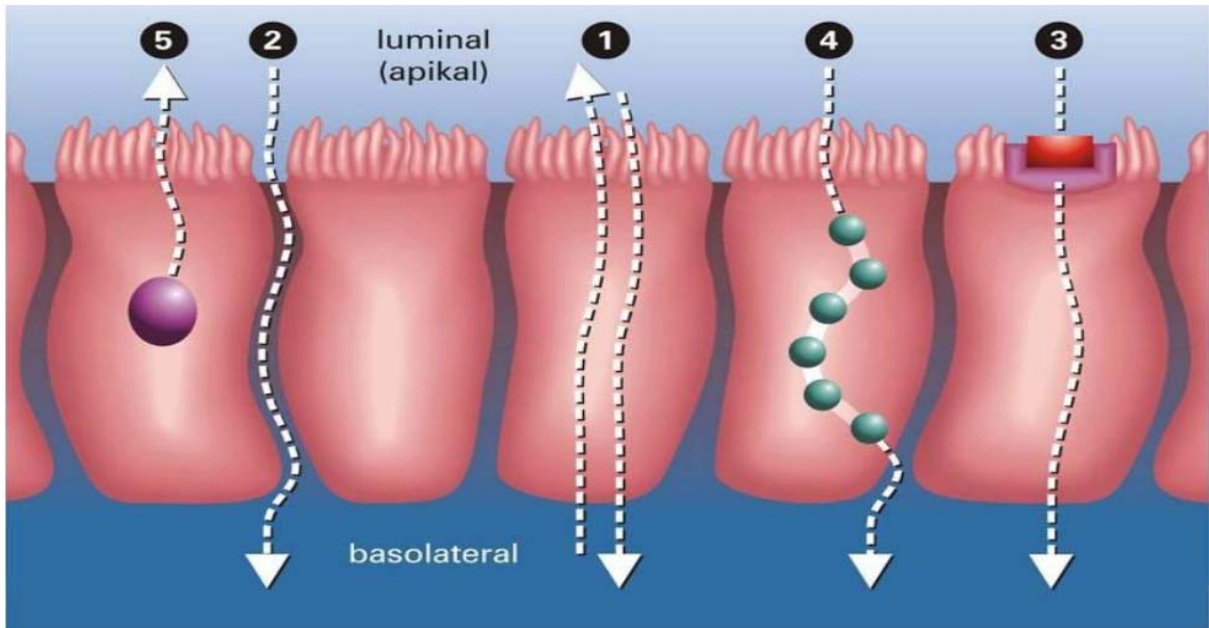


Abb. 56 Transportwege an einer epithelialen Barriere: 1 = transzellulär; 2 = parazellulär; 3 = Transporter-vermittelt; 4 = vesikulär; 5 = apikales Efflux System [72]

A → B Transport von 27-Deoxyactein in C001/C005

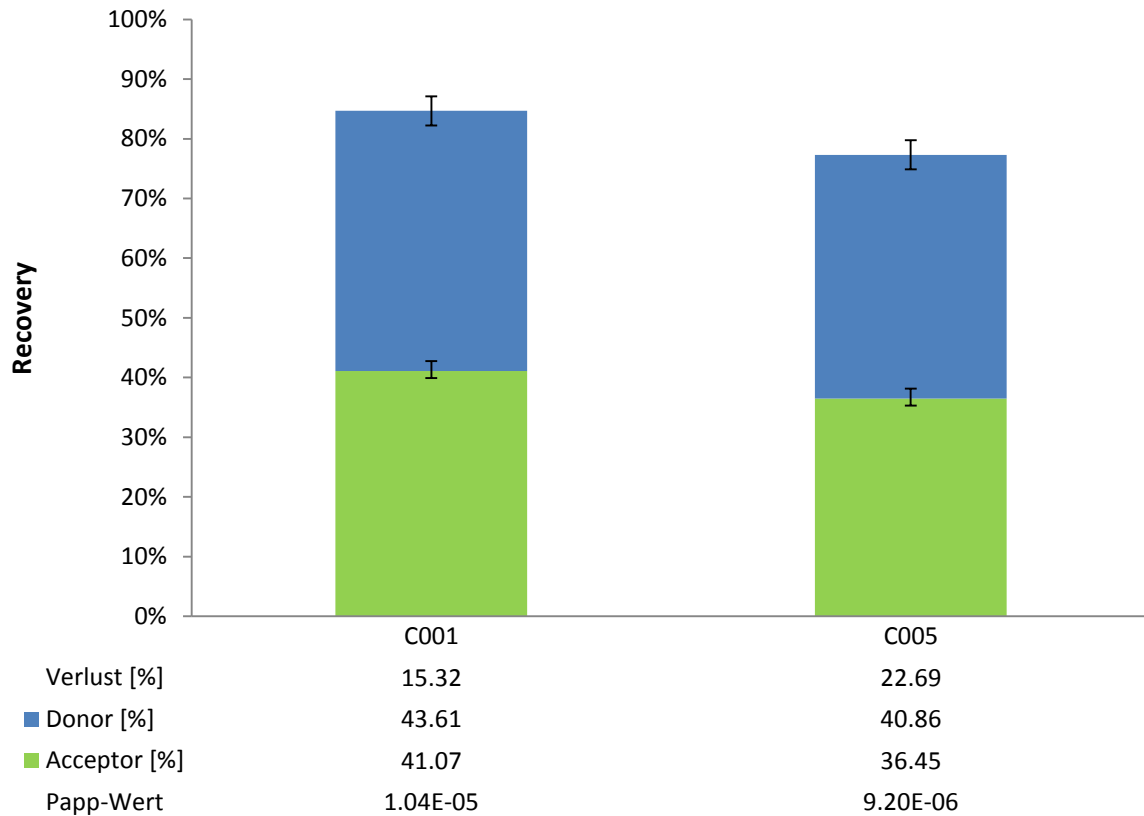


Abb. 57 A → B Transport von 27-Deoxyactein in C001 und C005

**B -> A Transport von
27-Deoxyactein in C001/C005**

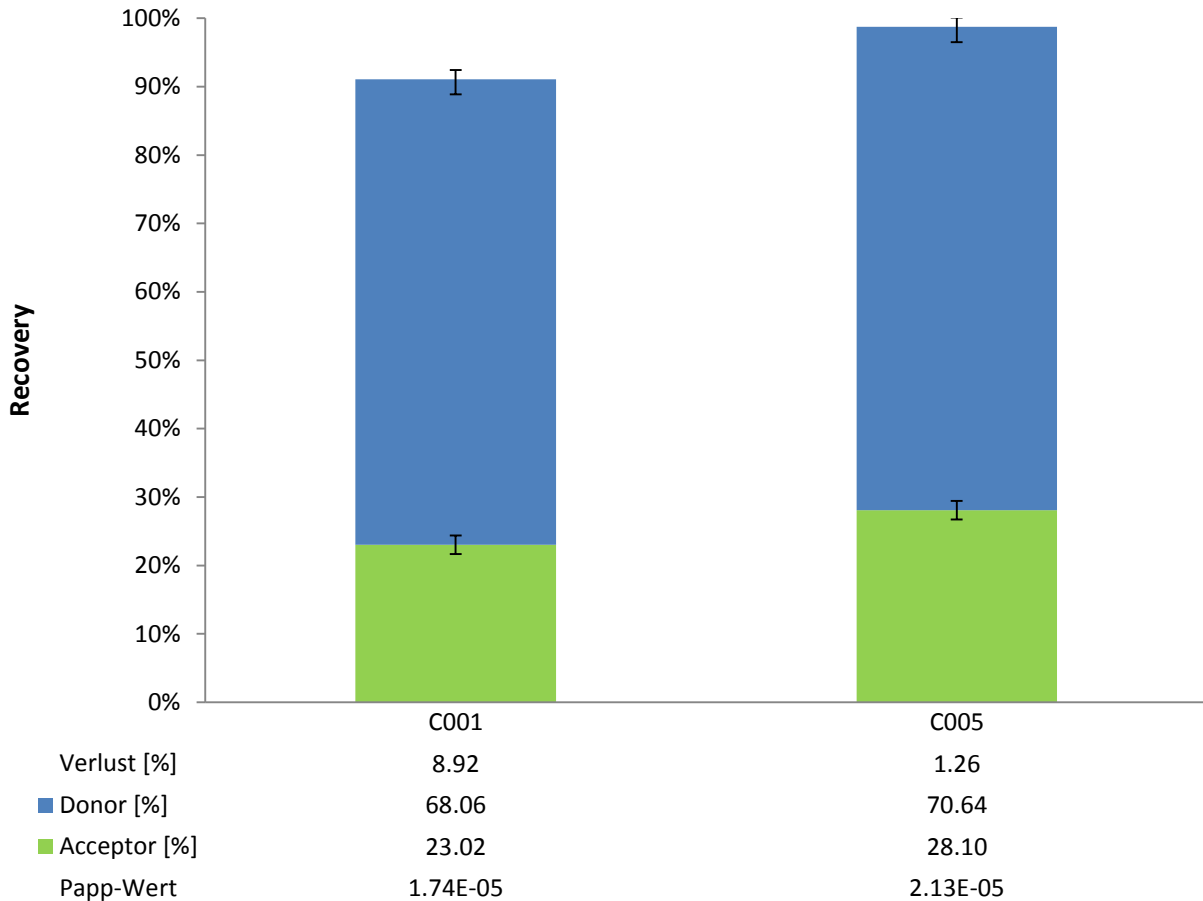


Abb. 58 B → A Transport von 27-Deoxyactein in C001 und C005

Im Vergleich der Fingerprint Chromatogramme zeigt sich deutlich, dass die Saponine gut von A nach B transportiert werden. Abb. 59 zeigt den Fingerprint der Ausgangslösung des Trockenextraktes C001 gegenüber den Fingerprint am Ende der Versuchsreihe im Donor-Kompartiment des Extraktes. Im Retentionsbereich von 2 – 4 min eluieren mit der HPLC-Methode 06 die Triterpenglycoside in *A. racemosa*. In diesem Bereich ist ein markantes Abnehmen der Signale zu beobachten.

Abb. 60 zeigt den Fingerprint des Trockenextraktes der zweiten Versuchsreihe, den Transport von B nach A. Erkennbar ist, dass die Ausgangslösung sich stark dem Fingerprint der Lösung am Ende des Permeabilitätsassay ähnelt.

ERGEBNISSE

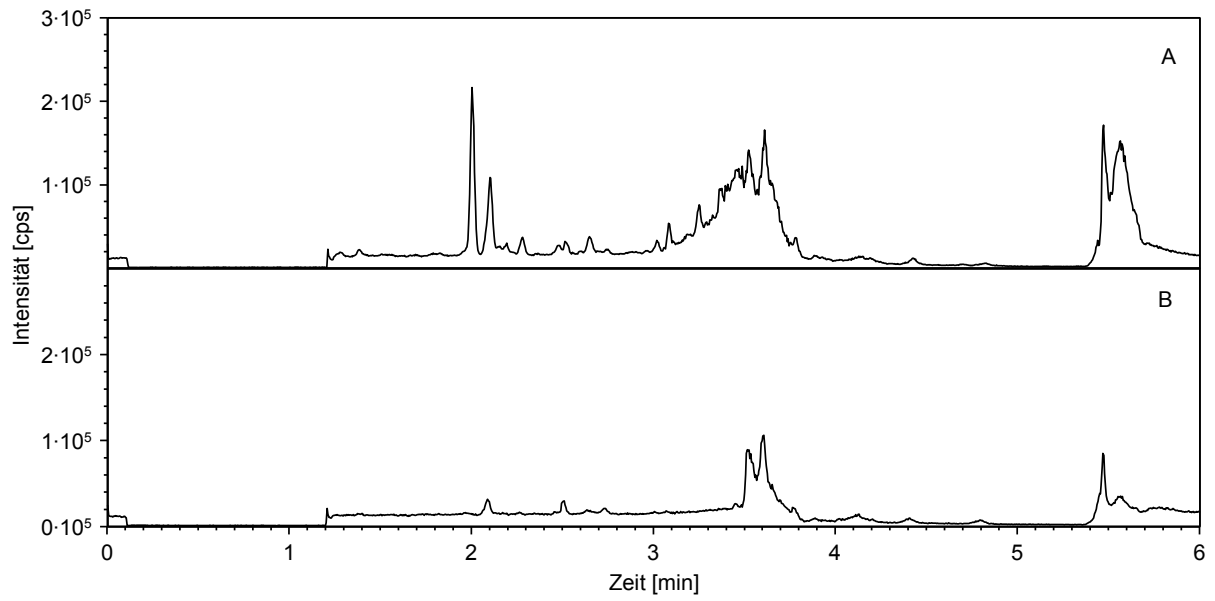


Abb. 59 AB-Transport: Chromatogramm des Gesamtextraktes zum Zeitpunkt T_0 (A); Chromatogramm des Gesamtextraktes zum Zeitpunkt T_{300} (B)

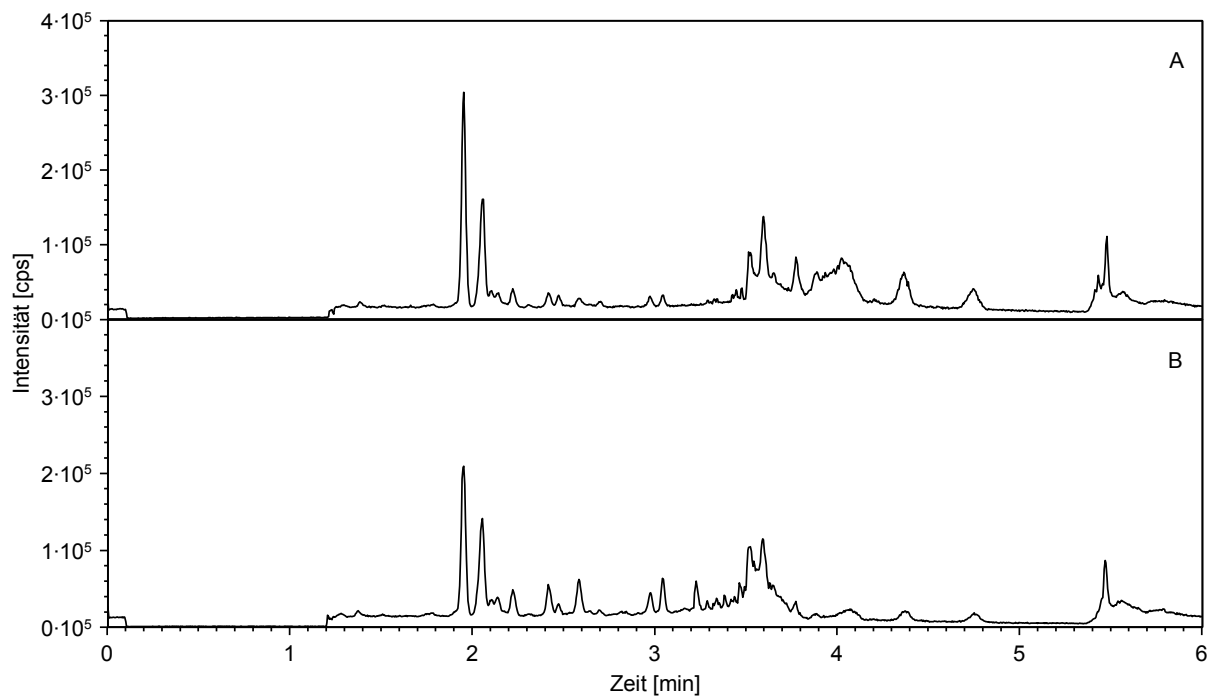


Abb. 60 BA-Transport: Chromatogramm des Gesamtextraktes zum Zeitpunkt T_0 (A); Chromatogramm des Gesamtextraktes zum Zeitpunkt T_{300} (B)

3.3. Serotoninbindung

Aus den Untersuchungen zu dem *Actaea racemosa* Extrakt war bereits bekannt, dass Verbindungen in der Pflanze enthalten sind, die eine Wirkung auf das serotonerge System haben. Aufgrund der Tatsache, dass die Arzneipflanze traditionell zur Behandlung der sogenannten „hot flushes“ eingesetzt wird, sollte die Bindungsaffinität zu dem Serotoninrezeptor 5-HT₇, anhand eines zellbasierten funktionellen Ligandenbindungsassays, untersucht werden. Dieser Serotoninrezeptor ist in hoher Dichte im Thalamus, im Hypothalamus und in Strukturen des limbischen Systems nachgewiesen worden [73]. Durch sein zentralnervöses Vorkommen wurde er bereits früher als mögliche Zielstruktur für die Entwicklung antipsychotisch wirksamer Arzneistoffe diskutiert [74, 75]. Dies stärkt die Tatsache, dass zahlreiche Antipsychotika und Neuroleptika (z.B. Clozapin, Pimozid, Zotepin und Methiothepin) eine hohe Affinität zum 5-HT₇-Rezeptor zeigen. Darüber hinaus sind zentrale 5-HT₇-Rezeptoren an der Regulation der Körpertemperatur sowie an der Steuerung des Lernens, des Tag-Nacht-Rhythmus und der Schlafphasen beteiligt [76]. Aus diesen Erkenntnissen wurde der 5-HT₇-Rezeptor auch als mögliches Wirkungstarget von *A. racemosa* festgelegt und ein funktioneller Ligandenbindungsassay durchgeführt.

Der Vorteil gegenüber einem Radioimmunoassay liegt darin, dass zur Detektion genau das Instrument eingesetzt wird welches später die Wirkung vermittelt - der Rezeptor selbst.

3.3.1. Bindung an 5-HT₇

Wie in Kapitel B.6.3.2 beschrieben, wurde sowohl die Reinsubstanz N ω -Methylserotonin als auch das reine Extraktionsmittel Ethanol 50 % (m/m) in identischer Weise zu den Proben aufgearbeitet und in dem Testsystem analysiert. In Abb. 61 sind die Dosis-Wirkungskurven der beiden Proben gegenüber gestellt. Damit zeigt sich, dass das Extraktionsmittel Ethanol keinen Einfluss auf das Testsystem zeigt, so dass eine Lösungsmittelbeeinflussung ausgeschlossen werden kann. N ω -Methylserotonin zeigt eindeutig einen Effekt auf den Rezeptor, der in der eingesetzten Konzentration das Wirkungsplateau jedoch noch nicht erreicht hat. Die EC₅₀ konnte bei 727,8 μ g/ml, entsprechend 38,3 nM, bestimmt werden.

Dieses Ergebnis wurde mit der EC₅₀ von C001 verglichen, denn die eingesetzte Konzentration der Positiv-Kontrolle N ω -Methylserotonin wurde auf den Gehalt in C001 berechnet (vgl. Kap. 6.3.2). Die Folge sollte eine übereinstimmende Dosis-Wirkungskurve sein (Abb. 62).

Die eingesetzten Drogenchargen zeigen in dem Assay unterschiedliche Effekte. Die EC₅₀ konnte bei einigen Proben aufgrund einer zu geringen Ausgangskonzentration nur über

ERGEBNISSE

Extrapolation berechnet werden. Die Werte liegen hierbei über 1000 $\mu\text{g/ml}$. Als höchste Konzentration wurde in dem Ligandenbindungsassay 2000 $\mu\text{g/ml}$ untersucht, da in dieser Konzentration der Ethanolgehalt in den Proben bereits zytotoxisch auf das Testsystem wirkte, wurden die Werte nicht zur Auswertung herangezogen werden.

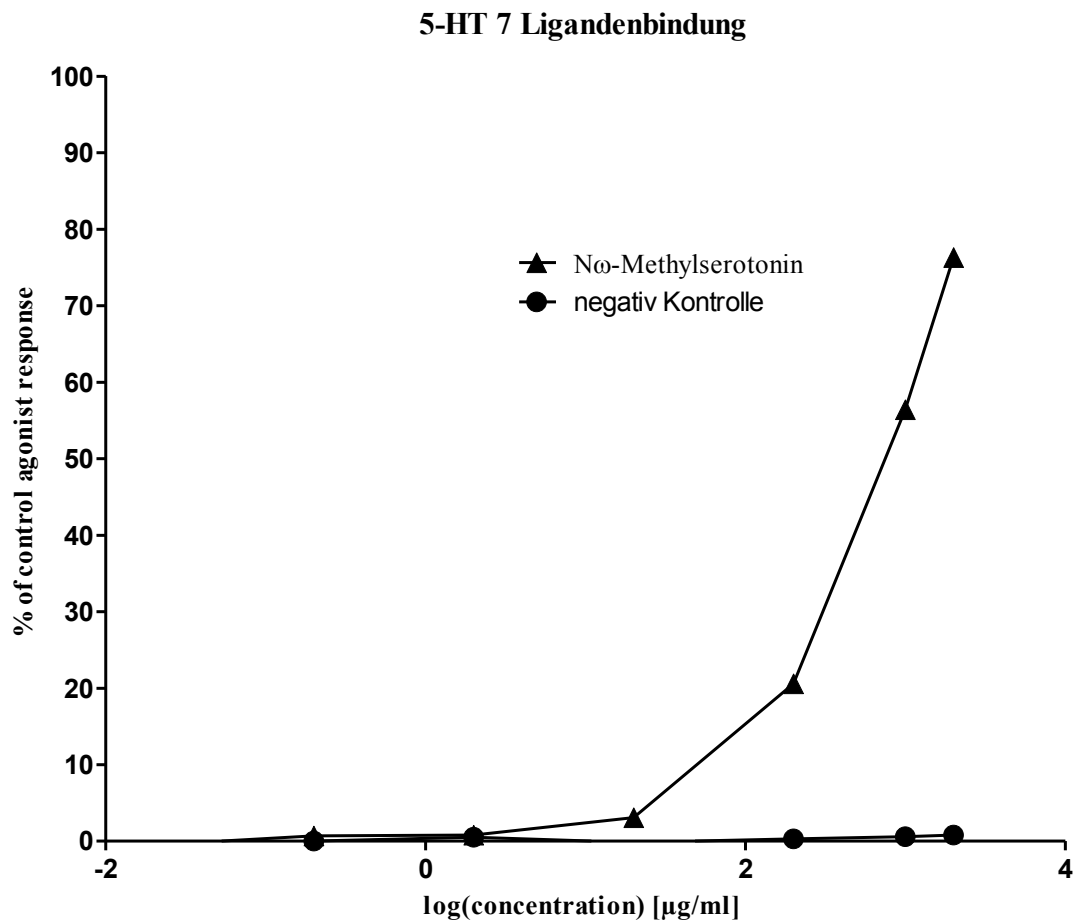


Abb. 61 Dosis-Wirkungskurve der Positiv- (N ω -Methylserotonin) und Negativkontrolle (Ethanol), dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Wiederholungsmessungen

ERGEBNISSE

5-HT₇ Ligandenbindung

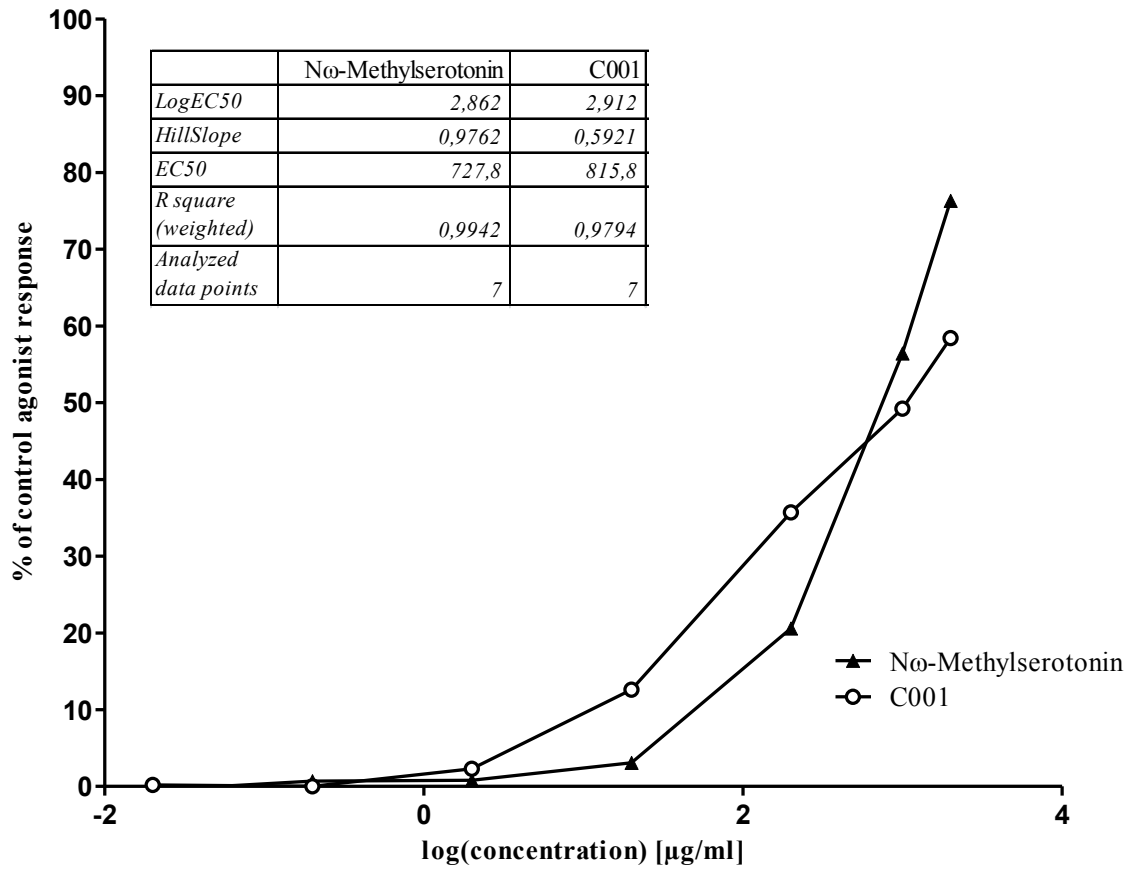
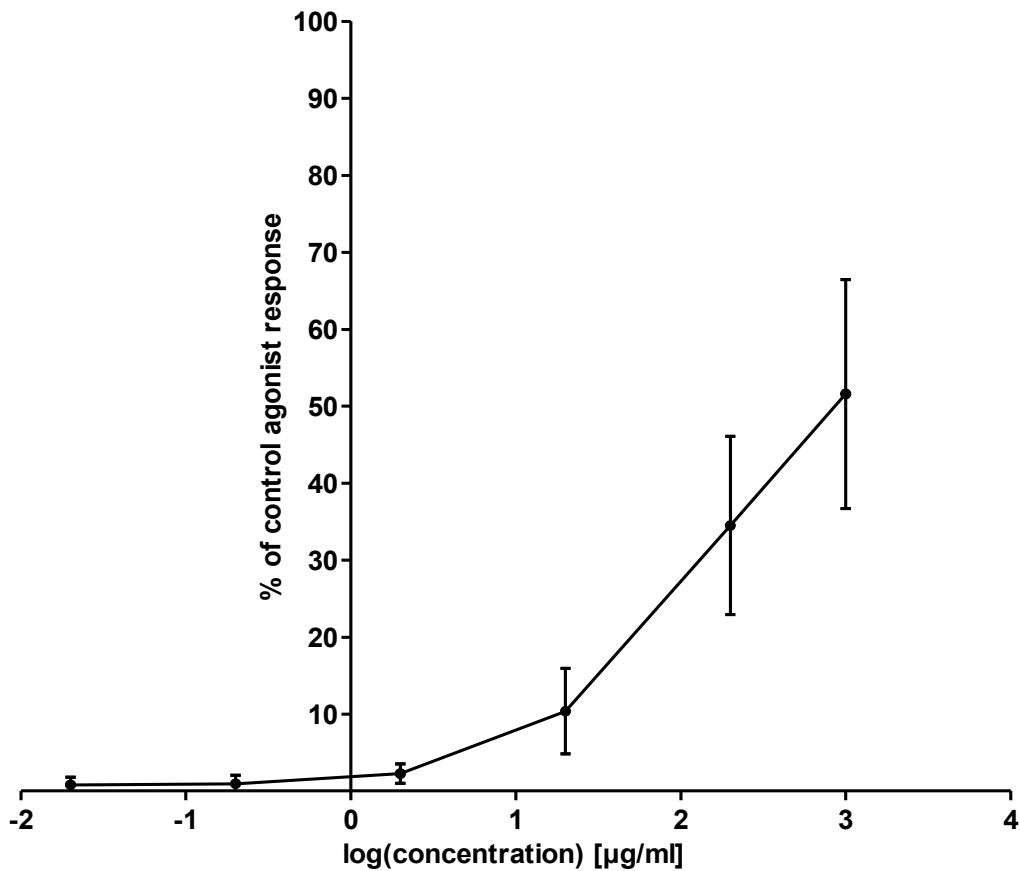


Abb. 62 Vergleich der Dosis-Wirkungskurven von Nω-Methylserotonin und C001, dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Wiederholungsmessungen

ERGEBNISSE

5 HT-7 Ligandenbindungsassay

N = 90



Result table:

| log(agonist) vs. normalized response -- Variable slope | |
|--|------------------|
| Best-fit values | |
| LogEC50 | 2.904 |
| HillSlope | 0.5448 |
| EC50 | 801.5 |
| Std. Error | |
| LogEC50 | 0.02321 |
| HillSlope | 0.01866 |
| 95% Confidence Intervals | |
| LogEC50 | 2.858 to 2.949 |
| HillSlope | 0.5082 to 0.5814 |
| EC50 | 721.7 to 890.0 |
| Goodness of Fit | |
| Degrees of Freedom | 538 |
| R square | 0.8506 |
| Absolute Sum of Squares | 35883 |
| Sy.x | 8.167 |
| Number of points | |
| Analyzed | 540 |

Abb. 63 Ergebnisse des funktionellen Ligandenbindungsassay, N = 90, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD

3.3.2. Gehaltsbestimmung N ω -Methylserotonin

Die Bestimmung der Gehalte an N ω -Methylserotonin wurde mit der HPLC-Methode 07 ermittelt. Dabei wurde eine 6-Punkt Kalibriergerade mit der Referenzsubstanz aufgestellt und mittels der Software Multiquant ausgewertet (Abb. 64). Es wurde das Fragment-Ion $[M-NH_2CH_3+H]^+$ m/z 160.0757 extrahiert, das Signal integriert und anschließend anhand der ermittelten Kalibriergerade quantifiziert. In Abb. 65 sind exemplarisch die XIC des Standards N ω -Methylserotonin und C001 bei m/z 160,0757 \pm 0,02 sowie das Fragmentspektrum der Verbindung aufgezeigt.

Ergebnis der Kalibration:

Die analytische Methode bietet unter Verwendung einer quadratischen Anpassungsfunktion mit einer quadratischen Gewichtung eine gute Regression und deckt einen Konzentrationsbereich von 0,9875 - 987,5 μ g/ml ab. Alle gefundenen Korrelationskoeffizienten der vier Validierungschargen sind \geq 0.998 (siehe Abb. 64).

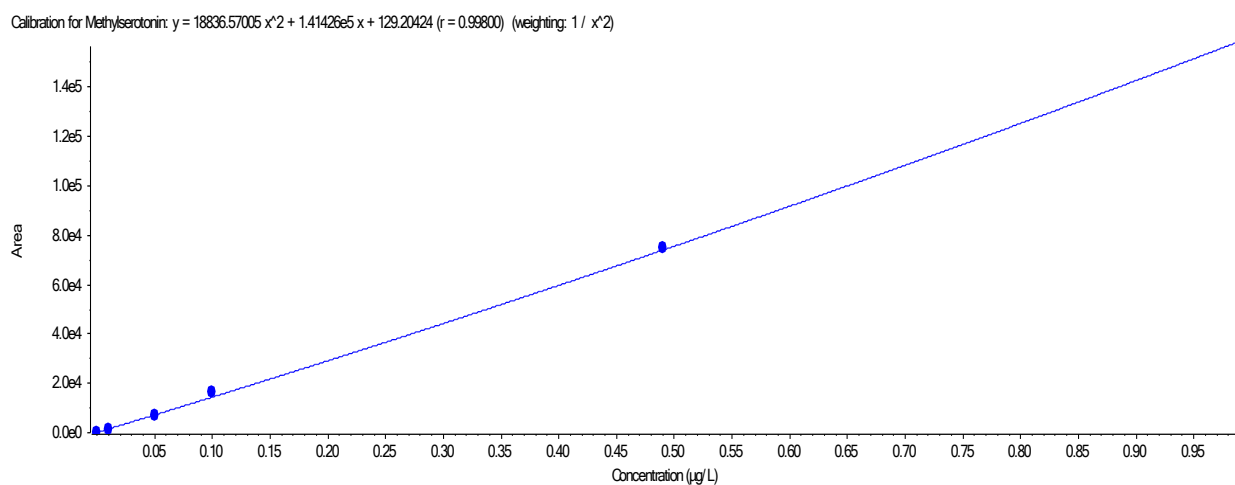


Abb. 64 Kalibriergerade N ω -Methylserotonin

ERGEBNISSE

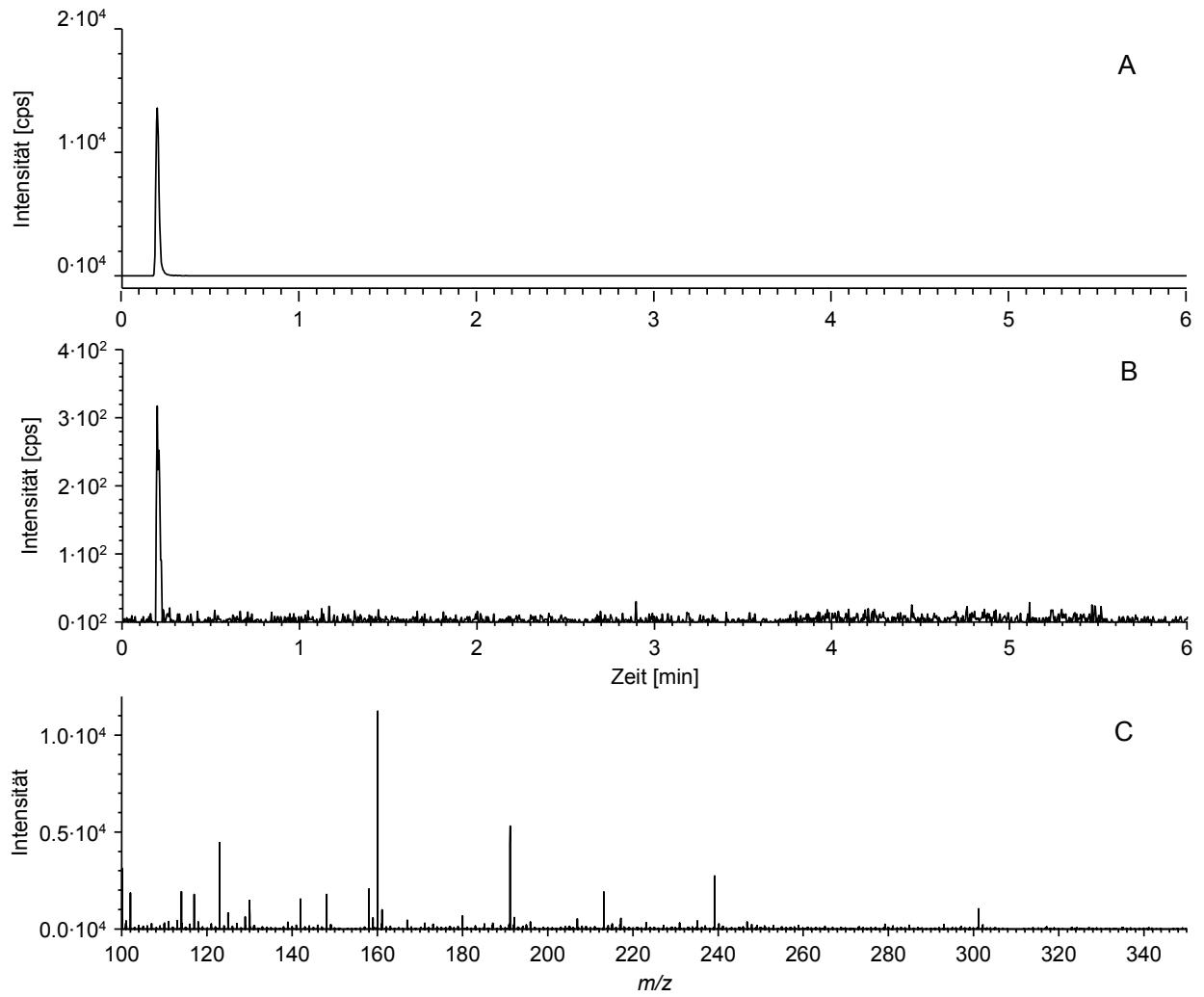


Abb. 65 XIC m/z 160,0757 \pm 0,02 N ω -Methylserotonin CAL-5 (A), XIC m/z 160,0757 \pm 0,02 C001 (B), Fragmentspektrum N ω -Methylserotonin (C)

ERGEBNISSE

Zur Bestimmung der Gehalte an N ω -Methylserotonin wurden die produzierten Daten mit Hilfe der Analysesoftware Multiquant ausgewertet. Dabei wurde der Peak des extrahierten Ion m/z 160,0757 [M-NH₂CH₃+H]⁺ integriert und gegen die Kalibriergerade der Gehalt der jeweiligen Droгенаuszüge berechnet.

Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung sind in Tab. 43 zusammengefasst.

Tab. 43 Übersicht über die Ergebnisse der N ω -Methylserotonin Gehaltsbestimmung

| | | | | | | | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Drogencharge | 49322 | 49324 | 49325 | 49326 | 49327 | 49520 | 49523 | 49529 | 50392 |
| Gehalt N ω -Methylserotonin [μg/100 mg] | 15,91 | 4,43 | 6,56 | 6,14 | 25,56 | 1,99 | 10,68 | 3,59 | 1,50 |
| Drogencharge | 50393 | 50394 | 50395 | 50459 | 50570 | 50571 | 50579 | 50584 | 50589 |
| Gehalt N ω -Methylserotonin [μg/100 mg] | 16,11 | 1,81 | 27,59 | 6,02 | 21,01 | 9,74 | 7,89 | 5,95 | 3,71 |
| Drogencharge | 50590 | 50591 | 50592 | 51565 | 51568 | 51575 | 51582 | 51666 | 51888 |
| Gehalt N ω -Methylserotonin [μg/100 mg] | 17,62 | 7,35 | 5,07 | 5,83 | 6,63 | 1,47 | 1,94 | 5,10 | 5,32 |
| Drogencharge | 51889 | 51890 | 51891 | 51893 | 51895 | 51896 | 52053 | 52085 | 52086 |
| Gehalt N ω -Methylserotonin [μg/100 mg] | 0,53 | 0,04 | 5,35 | 3,69 | 0,77 | 3,94 | 16,10 | 11,33 | 0,87 |
| Drogencharge | 52091 | 53701 | 53702 | 53703 | 53704 | 53705 | 53937 | 53938 | 53939 |
| Gehalt N ω -Methylserotonin [μg/100 mg] | 24,18 | 7,73 | 4,28 | 5,88 | 3,65 | 0,54 | 18,12 | 5,56 | 2,91 |
| Drogencharge | 53940 | 54119 | 54120 | 54122 | 54165 | 54166 | 54167 | 54169 | 54170 |
| Gehalt N ω -Methylserotonin [μg/100 mg] | 0,37 | 8,51 | 2,40 | 4,72 | 8,72 | 9,35 | 8,97 | 8,56 | 2,62 |
| Drogencharge | 54514 | 54515 | 54516 | 60383 | 60384 | 60639 | 60640 | 60641 | 60642 |
| Gehalt N ω -Methylserotonin [μg/100 mg] | 4,89 | 2,19 | 4,51 | 13,83 | 15,45 | 3,09 | 11,82 | 9,72 | 13,74 |

ERGEBNISSE

| Drogencharge | 60910 | 60911 | 60912 | 60915 | 60994 | 60995 | 60996 | 60997 | 2406-01 |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Gehalt Nω-Methylserotonin [µg/100 mg] | 15,03 | 0,33 | 7,02 | 11,66 | 0,18 | 14,53 | 2,53 | 6,14 | 27,36 |
| Drogencharge | 2406-02 | 2406-03 | 2406-04 | 2406-05 | 2406-06 | 2406-07 | 2406-08 | 2406-09 | 2406-11 |
| Gehalt Nω-Methylserotonin [µg/100 mg] | 13,76 | 7,27 | 5,75 | 29,96 | 31,41 | 21,50 | 14,58 | 8,80 | 13,35 |
| Drogencharge | 2406-13 | 2406-14 | 2406-15 | 2406-16 | 2406-17 | 2406-18 | C001 | C005 | |
| Gehalt Nω-Methylserotonin [µg/100 mg] | 8,98 | 9,65 | 5,96 | 0,69 | 6,38 | 2,44 | 5,92 | 1,00 | |

D. Diskussion

Trockenextrakte der Pflanze *Actaea racemosa* werden seit Jahren erfolgreich, sicher und wissenschaftlich belegt [15, 77-80] als alternatives Arzneimittel zur Hormonersatztherapie gegen klimakterische Beschwerden in der Menopause der Frau eingesetzt. Die Anwendungsgebiete umfassen die Linderung der durch die Wechseljahre bedingten psychischen und neurovegetativen Beschwerden wie Hitzewallungen, Schweißausbrüche und Schlafstörungen. Für die Wirksamkeit von *Actaea* Extrakten wurden bis vor einigen Jahren noch östrogene Effekte verantwortlich gemacht [16, 18, 81]. Heutige Studien diskutieren diesen Wirkungsmechanismus jedoch kontrovers und vermuten eine direkte zentrale Wirkung einzelner Substanzen aus den Extrakten der Traubensilberkerze [41, 43, 82, 83].

Die Ursache der Wechseljahresbeschwerden liegt begründet in der Änderung des Hormonhaushalts bedingt durch die endokrine Dysfunktion der Eierstöcke, eine sogenannte Ovarialinsuffizienz. Die Funktion der Eierstöcke und deren Produktion der weiblichen Sexualhormone, Progesteron und Östrogen, werden mithilfe des Gonadoliberin (GnRH) und der zwei Gonadotropine „luteinisierendes Hormon (LH)“ und „follikelstimulierendes Hormon (FSH)“ durch den Hypothalamus und die Hypophyse (Hirnanhangsdrüse) überwacht und deren Freisetzung geregelt [84]. Durch die erlöschende Eierstockfunktion kommt es zu einer Umstellung des Hormonhaushalts und den damit verbundenen Symptomen des Klimakteriums. Die Menopause ist im Regelfall nicht behandlungsbedürftig, bei ausgeprägten Beschwerden kann eine Behandlung allerdings von Nöten sein, um die Lebensqualität der Frau aufrecht zu erhalten. Langfristig unbehandelt kann sich das Risiko der Entwicklung einer Osteoporose und von Herzgefäßerkrankungen in der (Post-) Menopause erhöhen. Zu den wichtigsten akuten und chronischen Begleiterscheinungen der Peri- und frühen Postmenopause zählen vasomotorische Symptome (z. B. Hitzewallungen, Schweißausbrüche), Blutungsstörungen, Schlafstörungen, reduzierte Fertilität, urogenitale Beschwerden (z. B. Scheidentrockenheit, Inkontinenz und rezidivierende Harnwegsinfekte), zentralnervöse Symptome (z.B. Stimmungsschwankungen, Depression, Kopfschmerzen und Gedächtnisstörungen), sexuelle Funktionsstörungen, Beeinträchtigung des Knochen- und Gelenkapparates (Osteoporose und Gelenkschmerzen), Herzgefäßerkrankungen, Gewichtszunahme sowie Haut- und Haarveränderungen [85].

Ein Großteil der beschriebenen Symptome kann mit einer Hormontherapie positiv beeinflusst werden [86, 87]. Mit einer Hormontherapie sind jedoch auch relativ kurzfristig einsetzende Nebenwirkungen und langfristige Risiken assoziiert. Zu den kurzfristig beginnenden

DISKUSSION

Nebenwirkungen zählen z.B. Blutungsstörung, Brust- und Kopfschmerzen, Müdigkeit und Stimmungsschwankungen. Zu den langfristigen Risiken zählen ein erhöhtes Risiko für Herzgefäßerkrankungen und Brustkrebs sowie wahrscheinlich dementielle Erkrankungen [88-90].

In Anbetracht dieser Nebenwirkungen steht die Gabe von pflanzlichen Arzneimitteln, die Extrakte von *Actaea racemosa* enthalten, als wissenschaftlich fundierte Alternative zu einer Hormonsubstitution [89]. Auf dieser Grundlage wurde in dieser Arbeit ein Inhaltsstoffprofil der Arzneipflanze und deren Extrakt erstellt. Des Weiteren sollte mittels Fraktionierung die verantwortliche Inhaltsstoffgruppe für die Wirksamkeit der Pflanze erforscht werden. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Bioverfügbarkeit der Substanz 27-Deoxyactein anhand des Caco-2 Modells. Anhand dieser Resultate sollte auf die gesamte Bioverfügbarkeit der Stoffgruppe der Saponine geschlossen werden, da die Ergebnisse der pharmakologischen Studien des Endokrinologischen Instituts der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen die Saponine als eine effektive Stoffgruppe in *A. racemosa* identifizierten [42, 64, 65, 91]. Ebenfalls im Fokus dieser Arbeit steht die Frage, ob Extrakte der Traubensilberkerze eine Wirkung an dem Serotoninrezeptor 5-HT₇ ausüben und ob die identifizierte Substanz N ω -Methylserotonin in Korrelation zu dieser Wirkung steht.

1. Inhaltsstoffprofil *Actaea racemosa*

Der erste Schritt zur Charakterisierung der Droge gilt dem Extraktionsmittel. Dabei wurden die beiden gängigsten Extraktionsmittel für *A. racemosa*, Ethanol und 2-Propanol, untersucht. Zudem sollte herausgefunden werden unter welchen Bedingungen sich die Inhaltsstoffe am besten extrahieren lassen. Die Extraktion der gepulverten Droge bei 90 °C unter Rückfluss für 30 min ist in der Routineanalytik zur Bestimmung der Qualität der Pflanze über einen spezifischen Marker durchaus sinnvoll, jedoch können sich hier Kleinigkeiten, wie z.B. der Zerkleinerungsgrad der Droge, verstärkt direkt auf den Gehalt der Inhaltsstoffe in der Extraktionslösung auswirken. Zeitgleich kann es durch erhöhte Temperatur zu einer thermischen Zersetzung labiler Inhaltsstoffe wie der Triterpenglycoside vom Shengmanol-Typ, aber auch der Phenylpropanoide kommen, wodurch eine Gehaltsbestimmung dieser Substanzen fälschlicherweise zu gering ausfallen könnte. Der Zerkleinerungsgrad und die Dauer der Extraktion sind entscheidend für einen hohen Gesamtgehalt an Inhaltsstoffen eines *A. racemosa* Trockenextraktes. In Tab. 44 und Tab. 45 sind eindeutig die Unterschiede zwischen gepulverter Droge und grob geschnittenem Ausgangsmaterial aufgezeigt. Die lange Einwirkzeit des Extraktionsmittels auf das Rhizom-Material bewirkt dessen Quellen und die Inhaltsstoffe werden langsam aus der Droge gelöst. Diesen Unterschied konnte man bereits bei den TLC-Analysen erkennen. (vgl. C.1). Die Bewegungsmazeration ist zwar zeitaufwändig, aufgrund der geringen Temperaturbelastung jedoch eine sehr schonende Extraktionsmethode. Zusätzlich zeigt der Zerkleinerungsgrad der Droge keinen entscheidenden Einfluss auf die Gehalte der Zimtsäurederivate sowie der Saponine.

Im qualitativen HPLC-Fingerprint (HPLC-Methode 01) zeigen sich keine nennenswerten Unterschiede im Hinblick auf das Extraktionsmittel. Im Fingerprint-Vergleich der Triterpenglycoside, aufgenommen mit HPLC-Methode 03, ist das Peakmuster der 3 getesteten Chargen von *A. racemosa* zwischen den beiden Extraktionsmitteln vergleichbar.

Quantitativ zeigt sich bei der Bewegungsmazeration über 24 h im Gesamtgehalt der Zimtsäurederivate ein Extraktionsvorteil von Ethanol gegenüber 2-Propanol. Die Gehalte liegen im Durchschnitt ca. 30 % höher bei der Verwendung des primären Alkohols Ethanol (Tab. 44). 2-Propanol, als sekundärer Alkohol, löst offensichtlich die hydrophilen Stoffe der Silberkerze nicht so gut aus der Droge wie Ethanol.

Insgesamt betrachtet sind beide Lösungsmittel jedoch weitgehend gleichwertig auf ihre Extraktionseigenschaften zu beurteilen.

DISKUSSION

Tab. 44 Gesamtgehalt an Zimtsäurederivaten in gepulverter und geschnittener Droge in ethanolischer und isopropanolischer Lösung mit den jeweiligen Extraktionsverfahren, 30 min bei 90 °C und 24 h Bewegungsmazeration bei RT

| | Ch.: 0000027838 | | Ch.: 0000026867 | | Ch.: 0000026766 | |
|--|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| | 30 min | 24 h | 30 min | 24 h | 30 min | 24 h |
| Ethanol | | | | | | |
| Gesamtgehalt | | | | | | |
| Phenylpropanoide [mg/ 100mg pulv Droge] | 0,77 | 0,47 | 0,95 | 0,66 | 0,48 | 0,30 |
| Gesamtgehalt | | | | | | |
| Phenylpropanoide [mg/ 100mg conc Droge] | 0,48 | 0,46 | 0,72 | 0,63 | 0,33 | 0,29 |
| 2-Propanol | | | | | | |
| Gesamtgehalt | | | | | | |
| Phenylpropanoide [mg/ 100mg pulv Droge] | 0,78 | 0,29 | 0,96 | 0,57 | 0,47 | 0,17 |
| Gesamtgehalt | | | | | | |
| Phenylpropanoide [mg/ 100mg conc Droge] | 0,55 | 0,33 | 0,84 | 0,44 | 0,35 | 0,19 |

Tab. 45 Gesamtgehalt an Saponinen in gepulverter und geschnittener Droge in ethanolischer und isopropanolischer Lösung mit den jeweiligen Extraktionsverfahren, 30 min bei 90 °C und 24 h Bewegungsmazeration bei RT

| | Ch.: 0000027838 | | Ch.: 0000026867 | | Ch.: 0000026766 | |
|------------------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| | 30 min | 24 h | 30 min | 24 h | 30 min | 24 h |
| Ethanol | | | | | | |
| Gesamtgehalt Saponine | | | | | | |
| [mg/ 100mg pulv Droge] | 4,46 | 4,51 | 5,43 | 5,30 | 3,95 | 4,06 |
| Gesamtgehalt Saponine | | | | | | |
| [mg/ 100mg conc Droge] | 2,34 | 3,67 | 3,64 | 4,84 | 2,05 | 3,25 |
| 2-Propanol | | | | | | |
| Gesamtgehalt Saponine | | | | | | |
| [mg/ 100mg pulv Droge] | 4,57 | 3,63 | 5,33 | 5,62 | 3,99 | 4,08 |
| Gesamtgehalt Saponine | | | | | | |
| [mg/ 100mg conc Droge] | 2,05 | 3,48 | 3,45 | 4,21 | 1,81 | 3,25 |

Das Inhaltsstoffprofil von *A. racemosa* gliedert sich in 4 Inhaltsstoffgruppen. Darunter befindet sich mit den Kohlenhydraten die Hauptinhaltsstoffgruppe in der Rhizomdroge, welche mit 40 % - 60 % den Hauptbestandteil ausmachen. Das Disaccharid Saccharose stellt

DISKUSSION

mit ca. 20 % den Hauptanteil, gefolgt von den beiden Monosacchariden Glucose und Fructose mit ca. 10 % - 15 %. Mit 4 % - 8 % folgen die Triterpenglycoside. Die Phenylpropanoide machen 1 % - 3 % der Inhaltsstoffe aus. Die kleinste Gruppe sind die Alkaloide, die in der Traubensilberkerze identifiziert wurden. Eine genaue Gehaltsangabe der Alkaloide vom Cimipronidine-Typ lässt sich aufgrund fehlender Referenzsubstanzen abschließend nicht klären. Der Gehalt an N ω -Methylserotonin in den analysierten Drogenchargen lag bei einem durchschnittlichen Gehalt von 402 ng/100 mg Droge.

2. Fraktionierung und Wirksamkeit einzelner Fraktionen

Der Fraktionierungsprozess wurde an zwei unabhängig industriell hergestellten Trockenextraktchargen durchgeführt. In C001 wurde eine einzelne Drogencharge, während in C005 zwei *A. racemosa* Drogenchargen für die Produktion verwendet wurden. Qualitativ sind beide Extrakte gleichwertig, quantitativ unterscheiden sie sich in ihren Anteilen an Kohlenhydraten und Saponinen. C005 wies einen Zuckeranteil von 66 % (m/m) gegenüber 55 % (m/m) bei C001 in der hydrophilen Fraktion auf. Der Gesamtgehalt an Saponinen in C001 betrug 5,8 % gegenüber 4,0 % in C005 (siehe Kapitel C.2.3).

Durch die präparative Säulenchromatographie konnten angereicherte Fraktionen bestimmter Inhaltsstoffe aus den Extrakten hergestellt werden. Die Reproduzierbarkeit der Herstellung dieser Fraktionen konnte semiquantitativ über die Auswertung der Massenanteile als auch quantitativ über die Gehalte der Triterpene nachgewiesen werden.

Die histomorphometrischen Daten des Rattenversuches zeigen eine signifikante osteoprotektive Aktivität der lipophilen Gesamtfraktion, aber auch der L 2-Unterfraktion von C001. Interessanterweise konnte ebenfalls eine signifikante Wirkung auf die Spongiosadichte durch die hydrophile Unterfraktion H 3 nachgewiesen werden; die hydrophile Gesamtfraktion blieb hier aber unauffällig [64]. Dies beweist, dass nicht allein die Saponine an der osteoprotektiven Aktivität verantwortlich sind, sondern ebenfalls hydrophile Stoffe einen Einfluss haben könnten. Gleichwohl ist ein Zusammenspiel sowie synergistische Effekte der effektiven Verbindungen für eine bessere Wirkung des Gesamtextraktes gegenüber den Einzelfraktionen anzunehmen.

Alle scheinbehandelten Tiere entwickelten eine hochgradige Osteoporose, welche durch die Gabe von Östradiol-17 β verhindert wurde. Somit konnte die Validität des Tiermodells bestätigt werden. Der Gesamtextrakt hat eindeutig osteoprotektive Wirkungen. Sowohl der Abbau der ovariektomierten induzierten, computertomographisch bestimmten trabekulären Dichte als auch die Menge der histomorphometrisch gemessenen Trabekelgeflechte war durch den Traubensilberkerzenextrakt gegenüber den Kontrolltieren deutlich vermindert [45].

Diese und die bereits publizierten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass zum einen die Triterpenglycoside aus L 2 an dem antiosteoporotischen Wirkprinzip von *A. racemosa* beteiligt sind, aber auch eine noch unbekannt, hochpotente Substanz aus der hydrophilen Fraktion H 3. Eventuell ist diese Verbindung N ω -Methylserotonin, welche in der Unterfraktion H 3 identifiziert wurde.

In den letzten Jahren wurden Daten publiziert, die darauf hinwiesen, dass Fettzellen im Knochenmark deletäre Wirkungen auf den Knochenmetabolismus haben [92, 93]. Die dort

DISKUSSION

lokalisierten Fettzellen haben die gleichen Eigenschaften wie viszerale Adipozyten, d.h. sie sezernieren proinflammatorische Zytokine. Diese Zytokine, Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), Interleukin 6 (IL-6), Leptin, und andere, hemmen die Aktivität von Osteoblasten und fördern die Aktivität der knochenabbauenden Osteoklasten [94]. Unter Normalbedingungen steht die Wirkung dieser Zytokine im Gleichgewicht mit anderen Faktoren, die den Knochenaufbau fördern und den Abbau hemmen. Bei hohem Anteil von Fettzellen im Knochenmark führt dies zu Osteoporose. In den Tierexperimenten der Göttinger Kooperationspartner wurden zusätzlich zu den Knochenmessungen noch diverse andere Parameter bestimmt, so auch der Anteil von Fett im Knochenmark.

Bei den ovariectomierten Tieren war der Anteil an Fettzellen im Knochenmark sehr hoch und durch die Gabe von *A. racemosa* Extrakt sank dieser deutlich. Eine Korrelationsanalyse der Daten ergab eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Menge an Fettgewebe im Knochenmark und der Anzahl von Trabekel. In diese Analytik gingen die Daten aller Tiere ein (Kontrolltiere, CR BNO 1055, L- und H-Fraktion sowie L 1 - 3 und H 1 - 3 behandelte), und es war deutlich, dass ein hoher Fettbesatz im Knochenmark bei den ovariectomierten Tieren und denen, deren Trabekelmenge durch die Gabe der Testsubstanzen unbeeinflusst blieben, die größte Fettmasse und die geringste Knochenmasse zu Folge hatte.

Zusammenfassend scheint der Haupteffekt der Osteoprotektion einer Suppression der Adipogenese geschuldet zu sein, verbunden mit einer sichtbaren Reduktion an Knochenmarksfett und einer leichten Stimulation der Osteogenese [42, 64]. Der Mechanismus ist *in vivo* belegbar, besonders mit Blick auf die Hemmung der Adipogenese. Substanzen mit diesem Potential sind im Gesamtextrakt von *Actaea racemosa* BNO 1055, in der lipophilen Fraktion und deren Unterfraktion L2, sowie in der hydrophilen Gesamtfraktion nachgewiesen worden.

3. Bioverfügbarkeit von 27-Deoxyactein

Aus den *in vivo* Rattenversuchen ist bekannt, dass die Fraktion L 2 mit deren Hauptverbindungen Actein und 27-Deoxyactein für die Wirksamkeit von *A. racemosa* mitverantwortlich ist. Aus diesem Grund sollte die Bioverfügbarkeit von 27-Deoxyactein anhand des wissenschaftlich anerkannten Caco-2 Modells untersucht werden und eine Klassifizierung der Substanz nach dem BCS-System vorgenommen werden [56].

Die niedrige Löslichkeit lipophiler Substanzen ist eine der Hauptursachen schlechter Bioverfügbarkeit [95, 96]. Der Einsatz von Phospholipiden hat sich anhand zahlreicher Beispiele in der Praxis bewährt. Das schwer lösliche Cyclosporin A (9,26 µg/ml) konnte in sphärischen Lipidvesikeln mit einer mittleren Größe von 64 nm im Rahmen von pharmakokinetischen Studien die Bioäquivalenz gegenüber Neoral nachgewiesen werden [96-98]. In einem weiteren Beispiel wurden die Plasmawerte und die Entwicklung von Arthritis in Ratten nach Gabe des Immunsuppressivum Rapamycin in Kombination mit Phosal 50 PG (50% PC in Kombination mit Mono- und Diglyceriden aus der Sonnenblume und Ascorbylpalmitat) mit einer Tween 80 Formulierung verglichen. Dabei waren die Plasmawerte der PC-Formulierung deutlich höher, so dass bereits 1/6 der eigentlichen Rapamycin Dosis zur Arthritis-Behandlung ausreichte [96, 98, 99].

Das adsorptive Verhalten an Oberflächen des Testsystems und die geringe Löslichkeit hoch lipophiler Substanzen führen oftmals zu erheblichen Schwierigkeiten bei Permeabilitätsuntersuchungen im Caco-2 Zellmodell. Aus diesem Grund wurden Löslichkeitsversuche des Extraktes in dem Transportpuffer durchgeführt (C.3.2.1).

Daher sollte auch der Einfluss der Phospholipide auf die Löslichkeit von 27-Deoxyactein untersucht werden. Beim gesamten *in vitro* Versuchsablauf wurde präzise auf die Simulation der physiologischen Verhältnisse geachtet. Vor diesem Hintergrund wurde als Transportpuffer das biorelevante Medium FaSSIF eingesetzt [100, 101]. FaSSIF („*fasted state intestinal fluid*“) soll *in vitro* die Einnahme in nüchternem Zustand simulieren, während FeSSIF („*fed state simulating intestinal fluid*“) aufgrund der 5-fach höheren Konzentration an Na-Taurocholat/Lecithin den Zustand der postprandialen Einnahme simulieren würde. Durch abweichende Partikelgrößen unterscheiden sich FaSSIF und FeSSIF hinsichtlich ihrem Anteil an lipophilen/hydrophilen Kompartimenten und zeigen dadurch bereits ein unterschiedliches Lösungsverhalten [102]. Im FaSSIF herrscht ein Ungleichgewicht zwischen Gallensalz und Lipid zugunsten des Lipids, was zu einer verstärkten Mizellenbildung führt. Die Löslichkeitsversuche wurden in dem verwendeten FaSSIF Transportmedium durchgeführt. Es zeigte sich, dass 27-Deoxyactein bei einer Extraktkonzentration von 2 g/L vollständig in

DISKUSSION

Lösung vorliegt. Der Einsatz von hochsensitiven analytischen Messmethoden (triple Quadrupole time-of-flight Massenspektrometer), ließ den Einsatz einer noch geringeren Ausgangslösung von 200 mg/L bei der Versuchsdurchführung zu. Damit ist sichergestellt, dass die gesamte Menge an 27-Deoxyactein in Lösung vorliegt und für die Permeabilitätsstudie zur Verfügung steht.

Um der Adsorption und der geringen Löslichkeit entgegenzuwirken, sind in der Literatur diverse Hilfsstoffe beschrieben. Allerdings ist die Verwendung dieser Co-Surfactants oder organischen Lösungsmittel aufgrund ihrer zellschädigenden Wirkung nur sehr begrenzt möglich [103-106]. Wie die Toxizitätsversuche bewiesen haben, wirkt der Trockenextrakt von *Actaea racemosa* nicht zellschädigend, so dass die Zellpassage über den gesamten Verlauf des Transportversuches intakt ist und zu keiner Zeit die Transportwege durch die Monolayerschicht beeinflusst werden.

Einen Zusatz von 4 % BSA als Co-Surfactant im Receiver Kompartiment, wodurch ein höherer Konzentrationsgradient erreicht werden soll, erwies sich als nicht geeignet, da die Substanz nicht mehr detektiert werden konnte. Ein Grund hierfür scheint eine unspezifische Bindung von 27-Deoxyactein an Albumin bzw. Plasmaproteinen zu sein, wodurch die Verbindung gebunden in Lösung vorliegt und analytisch nicht mehr detektieren werden kann. Versuche ohne 4 % Zusatz von BSA im Receiver Kompartiment zeigten, dass sowohl optimale sink-Bedingungen vorliegen, als auch der Verlust an nicht detektierbarer Substanz nur noch sehr gering ausfällt.

Anhand dieser Vorversuche kann davon ausgegangen werden, dass, wie Abb. 54 zeigte, bis zu 75 % der Substanz an BSA gebunden im Donor-Kompartiment vorliegt. Durch diese Bindungsaffinität wird vermutlich die hämolytische Aktivität der Triterpene herabgesetzt, so dass ein Bluttransport ohne Zerstörung der Erythrozyten möglich ist [107, 108]. Durch die Bindung der in *A. racemosa* vorkommenden Triterpenglycoside an Albumin kann jedoch ebenfalls die Bioverfügbarkeit der Verbindungsklasse beeinträchtigt werden. Ob gebundenes 27-Deoxyactein oder ungebundenes für die Wirkung verantwortlich ist, erfordert weitergehenden Untersuchungen.

Die Ergebnisse des Permeabilitätsassay, ohne Zusatz von 4 % BSA, zeigten einen Verlust von nicht detektierbarer Substanz von ~ 20 % bei den Transporten von A → B bzw. ~ 5 % von B → A, was vermutlich auf Adsorption an die Oberfläche des Testsystems begründet ist (vgl. Abb. 55). Bei der Analyse des Zellhomogenisat konnte die Verbindung nicht detektiert werden, so dass ein Einschluss in die Zellen ausgeschlossen werden kann und damit der

DISKUSSION

Verlust hauptsächlich durch adsorptive Prozesse an der Oberfläche der Transwell-Platten zu erklären ist.

Für die abschließende Auswertung des Transportes über die epitheliale Monolayer Zellschicht wird der Permeabilitätskoeffizient der Substanz berechnet, der auch Auskunft über die mögliche Absorption über das jeweilige Epithel gibt [56, 109]. Die Berechnung erfolgt nach der Formel in Kapitel B.6.2.8. Oral verabreichte Arzneistoffe zeigen üblicherweise einen Papp-Wert in der Größenordnung von $10 \times e^{-6}$ cm/sec. Aus zahlreichen Experimenten kann man ableiten, dass ein Papp über $10 \times e^{-6}$ cm/sec eine hohe Bioabsorption bedeutet (> 90 %), während ein Papp $< 0,1 \times e^{-6}$ auf eine schlechte orale Absorption der Substanz hinweist [56]. Die Eingliederung der Substanz 27-Deoxyactein erfolgte dabei nach dem Biopharmazeutischen Klassifizierungssystem BCS, welches Arzneistoffe hinsichtlich ihrer zu erwartenden Bioverfügbarkeit einteilt. Anhand dieser Klassifizierung ist es möglich, eine Prognose darüber zu erstellen, ob Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption nach oraler Gabe durch die physikalischen Eigenschaften des Arzneistoffes oder durch physiologische Gegebenheiten bestimmt sind, da im Wesentlichen die orale Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes von seiner Löslichkeit und seinem Permeationsvermögen abhängig ist [56, 109].

Tab. 46 Transportmechanismus durch Bestimmung der Efflux ratio

| Transport Mechanismus | Papp (BA) / Papp (AB) |
|-----------------------|-----------------------|
| Absorption (aktiv) | $\ll 1$ |
| Diffusion (passiv) | ~ 1 |
| Sekretion (aktiv) | $\gg 1$ |

Die ermittelten Papp-Werte für den Transport von A \rightarrow B von 27-Deoxyactein lassen den Schluss zu, dass die Verbindung gut oral absorbiert wird. Der Permeabilitätskoeffizient für den Transport von basolateral nach apikal ist mit $17,4 \times e^{-6}$ cm/sec bzw. $21,3 \times e^{-6}$ cm/sec jedoch größer als der Papp_(AB). Die Efflux-ratio lässt sich aus den Quotienten aus Papp_(BA) und Papp_(AB) berechnen und somit eine Vorhersage eines möglichen Transportweges durch das Zellsystem generieren. Aufgrund der berechneten Efflux-ratio von 1,68 für C001 und 2,31 für C005 kann davon ausgegangen werden, dass die Substanz einer aktiven Sekretion, evtl. durch p-Glykoprotein, aus dem Receiver Kompartiment unterliegt (Tab. 46). Eine endgültige Aussage darüber welcher Carrier für den Rücktransport verantwortlich ist und welcher

DISKUSSION

Transportweg an der epithelialen Barriere für die Triterpenglycoside vorherrscht, bedarf weiterer Versuche und eine Spezifizierung des Caco-2 Modells.

Die Eingruppierung von 27-Deoxyactein mit Hilfe der Guideline des BCS erfolgt in Klasse 3. Diese Klasse ist charakterisiert durch eine hohe Löslichkeit und geringe Permeabilität [109, 110]. Eine Substanz wird als gut permeabel definiert, wenn mehr als 90 % der Anfangskonzentration über die Monolayer transportiert werden. Ein Wirkstoff gilt als gut löslich, wenn die am höchsten eingesetzte Konzentration in 250 ml Wasser über einen pH-Bereich von 1 - 7,5 leicht in Lösung zu bringen ist. Die Tagesdosis von *A. racemosa* Trockenextrakt liegt bei 5,6 mg. Die eingesetzte Konzentration für die Permeabilitätsstudie lag bei 200 mg/L, berechnet auf 250 ml ergibt sich eine Konzentration bei der die Substanz vollständig in Lösung vorliegt von 40 mg/ 250 ml. Folglich kann 27-Deoxyactein als gut löslich in dem BC-System eingestuft werden.

Die Permeabilität von 27-Deoxyactein lag bei 41 % bei einem Papp-Wert von $10,4 \times 10^{-6}$. Anhand der BCS-Guideline leitet sich daraus eine mittlere Permeabilität ab. Zusammenfassend ergibt sich daraus die Eingruppierung in Klasse 3.

4. Wirkung am Serotoninrezeptor 5-HT₇

Ein erweitertes Untersuchungsprogramm des Tiermodells an der ovariectomierten Ratte lieferte Hinweise, dass der Gesamtextrakt und vor allem die hydrophile Tochterfraktion H 3 Temperatur-senkende Wirkung besitzt [111]. Dieser Effekt konnte nicht in der lipophilen Tochterfraktion nachgewiesen werden. Die Wirkung des *Cimicifuga*-Extraktes auf Hitzewallungen scheint somit in der hydrophilen Fraktion zu liegen. Somit könnte dieses Wirkprinzip theoretisch isoliert und weiter angereichert werden, um ein speziell für die Hitzewallungen zugeschnittenes Medikament zu entwickeln.

Hedlund et. al. haben herausgefunden, dass speziell der Serotoninrezeptor 5-HT₇ für die Thermoregulation im menschlichen Körper verantwortlich ist [76]. Der Rezeptor ist hauptsächlich im Thalamus und Hypothalamus zu finden, aber auch in hohen Zahlen im Hippocampus und Cortex [73]. Neben der Thermoregulation ist er außerdem für den Schlaf-Wach-Rhythmus, das Gedächtnis und das Wissen verantwortlich. Es wird zudem diskutiert, ob dem Rezeptor Einfluss auf Stimmungsschwankungen zugeschrieben wird [74, 112].

Die Wirkung von *A. racemosa* auf dopaminerge, serotonerge und noradrenerge Rezeptoren wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen belegt [10, 15, 34, 36, 41, 44]. Anhand eines funktionalen zellulären Ligandenbindungsassays mittels humaner rekombinanter CHO Zellen sollte ein agonistischer Effekt der Traubensilberkerzenextrakte am 5-HT₇ Rezeptor bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen einen Effekt des Extraktes an dem Gs-Protein gekoppelten Rezeptor, wodurch die Adenylatcyclase aktiviert und cAMP ausgeschüttet wird [113, 114]. N ω -Methylserotonin wird ein agonistischer Effekt zugeschrieben. Der Gehalt der Substanz in den untersuchten Drogenextrakten korreliert ebenfalls mit der ermittelten mittleren effektiven Konzentration (EC₅₀). Es ist aber weiterhin zu diskutieren, ob noch andere Verbindungen in *A. racemosa* ebenfalls einen positiven Effekt auf den Serotonin-Rezeptor ausüben. Cicek et al. konnten Effekte von Verbindungen der Traubensilberkerze auf den GABA_a Rezeptor nachweisen; diese Wirkungen gingen vor allem von Saponinen aus [115]. Ein einziger Wirkmechanismus von *A. racemosa* lässt sich hierdurch nicht belegen. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die Verbindungen der Arzneipflanze über unterschiedliche Rezeptoren und Angriffspunkte ihre pharmakologische Wirkung ausüben.

In dieser Arbeit konnte jedoch anhand der Versuche an Drogenextrakten aus unterschiedlichen Drogenmustern ein Wirkungsmechanismus von *A. racemosa* an dem Serotoninrezeptor belegt werden. Diese Daten werden auch durch die Ergebnisse von Powell et. al. belegt, die eine Bindung von N ω -Methylserotonin an dem 5-HT₇ Rezeptor von IC₅₀ = 23 pM feststellten, als auch einen Anstieg von induziertem cAMP EC₅₀ = 22 nM und

DISKUSSION

eine Hemmung von Serotonin Wiederaufnahme von $IC_{50} = 490 \text{ nM}$ [35]. Die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigten die Ergebnisse von Powell et. al.. In dem durchgeführten funktionellen Ligandenbindungsassay konnte ein Anstieg von cAMP durch N ω -Methylserotonin in Höhe von $EC_{50} = 38,3 \text{ nM}$ ermittelt werden.

Dies lässt die Vermutung zu, dass bereits geringe Konzentrationen, wie sie in *A. racemosa* gefunden wurden, eine Wirkung zeigen könnten.

Durch die Identifikation und Wirksamkeit von N ω -Methylserotonin in *A. racemosa* konnte ein relevanter Wirkstoff der Pflanze identifiziert werden. Ein wahrscheinlicher *in vivo* Wirkungsmechanismus der Traubensilberkerze kann anhand der erzielten Ergebnisse, sowie im Vergleich mit den Literaturdaten [35], hypothetisch aufgestellt werden. Es ist eher davon auszugehen, dass N ω -Methylserotonin nicht alleine für die Wirkung verantwortlich ist. Der Vergleich mit der mitgeführten Positivkontrolle Serotonin, für die eine $EC_{50} = 39 \text{ nM}$ bestimmt wurde, zeigt, dass sehr hohe Konzentrationen an *A. racemosa* Extrakt in einer Einzeldosis *in vivo* notwendig sind um eine Wirkung zu erzielen bzw. eine lange Exposition nötig ist um ein Anfluten des Wirkstoffs zu erreichen, dass dieser in ausreichender Konzentration im Hypothalamus vorliegt. Um dies zu verifizieren, sind jedoch umfangreiche klinische Studien notwendig die im Rahmen dieser Arbeit nicht umzusetzen sind.

Durch den Fraktionierungsprozess wäre eine gezielte Anreicherung der Substanz in einem hochspezifischen Trockenextrakt möglich, wodurch die Wirksamkeit entscheidend verbessert werden könnte. Ein pflanzliches Arzneimittel mit einem *Actaea racemosa* Trockenextrakt, angereichert mit N ω -Methylserotonin, welches primär gegen die Anwendungsgebiete der klimakterischen Beschwerden der Frau wie Schweißausbrüche und psychischen Stimmungsschwankungen wirksam wäre, könnte auf den Markt durchaus erfolgsversprechend sein und wäre eine prospektive und spezifische alternative Therapiemöglichkeit. Weitere Untersuchungen und klinische Studien sind diesbezüglich notwendig, um sowohl ein Wirkoptimum der Substanz festzustellen als auch um die Risiken und Nebenwirkungen der Substanz in einem höheren Konzentrationsbereich zu untersuchen.

Überdies wäre anhand der *in vivo* Untersuchungen am Rattenmodell ein Präparat entwickelbar, welches zielgerichtet auf die Wirksamkeit bei der Prophylaxe einer postmenopausalen Osteoporose zugeschnitten ist. Durch gezielte Anreicherung der wirksamen Fraktion L 2 und gleichzeitig einer gezielten Abreicherung der unwirksamen Fraktionen, im Speziellen L 1 und H 1 sowie H 2, wäre anhand der Ergebnisse in dieser Arbeit und der gezeigten Reproduzierbarkeit des Fraktionierungsprozesses möglich.

DISKUSSION

Der Traubensilberkerze wird auch in Zukunft eine große Aufmerksamkeit in der Therapie der klimakterischen Beschwerden gewidmet werden. Ihre Wirksamkeit ist unbestritten und der Einsatz in der Hormonersatztherapie ist in Bezug auf ihr Nebenwirkungsspektrum weiter auf dem Vormarsch.

Die gezielte Anreicherung von wirksamen Substanzen aus Pflanzenextrakten in ein pflanzliches Arzneimittel kann für die Entwicklung hochwirksamer und zielgerichteter Phytopharmaka für die Therapie bestimmter Krankheitsbilder ein neues und innovatives Herstellverfahren und die Zukunft hochwirksamer pflanzlicher Arzneimittel sein.

E. Zusammenfassung

Eine Trockenextrakt-Zubereitung aus dem Wurzelstock der Traubensilberkerze (*Actaea racemosa* L., syn. *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt.) wird in Fertigarzneimitteln seit Jahrzehnten erfolgreich und wissenschaftlich belegt zur Linderung von Wechseljahresbeschwerden eingesetzt. Die Anwendungsgebiete umfassen Hitzewallungen und Schweißausbrüche, psychische Beschwerden, Schlafstörungen, Störungen der Blase und Harnwege sowie die Prophylaxe bei der Entwicklung einer menopausalen Osteoporose. Pflanzliche Fertigarzneimittel, die *A. racemosa* Zubereitungen enthalten, zeigen sehr gute evidenzbasierte Wirksamkeit bei hoher Arzneimittelsicherheit und geringem Nebenwirkungsrisiko. Dadurch bestätigt sich der Einsatz als Alternative zu einer Hormonersatztherapie, welche mit höherem Nebenwirkungsrisiko behaftet ist, sowie mit dem Risiko der Entwicklung eines Mammakarzinoms. Der Aufklärung der Wirkungsweise sowie dem Erforschen der aktiven Wirkstoffe aus dem BNO 1055 Trockenextrakt aus *A. racemosa* wurde das Hauptaugenmerk in der Arbeit gewidmet.

Durch die Entwicklung eines Fraktionierungsprozess konnte der Trockenextrakt in eine lipophile und eine hydrophile Fraktion getrennt werden. Anschließend wurden mittels präparativer Chromatographie beide Fraktionen in 6 Unterfraktionen geteilt. Mit hochsensitiver Massenspektrometrie (triple ToF/MS) konnte eine umfassende Charakterisierung der Fraktionen bzw. des Gesamtextraktes durchgeführt werden. Actein und 27-Deoxyactein konnten als Hauptinhaltsstoffe in der Subfraktion L 2 identifiziert werden, während die lipophileren Saponine wie Cimiracemosid C, Cimigenolxylopyranosid und Acetylcimigenolxylopyranosid in der Fraktion L 3 vorhanden waren. Die hydrophilen Unterfraktionen sind charakterisiert durch den hohen Anteil an Zuckern (H 1) und die bekannten Phenylpropanoide (H 2). In der Unterfraktion H 3 konnten die N-haltigen Verbindungen Cimipronidin und Cyclocimipronidin, sowie das Serotonin-Analogon N ω -Methylserotonin nachgewiesen werden.

Alle Unterfraktionen, der Gesamtextrakt sowie die lipophile und hydrophile Fraktion wurden in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen auf pharmakologische Wirkung untersucht. Der Gesamtextrakt, die LF und die L 2 Fraktion konnten signifikant die Entwicklung einer Osteoporose von ovariectomierten Ratten verhindern.

Aufgrund der Wirksamkeit der L 2-Fraktion und deren Hauptinhaltsstoff 27-Deoxyactein wurde diese Verbindung mit Hilfe eines Caco-2 Permeabilitätsassay auf ihre Bioverfügbarkeit

ZUSAMMENFASSUNG

untersucht. Zu diesem Zweck konnte eine LC-MS Methode (HPLC-Methode 06) zur Quantifizierung von 27-Deoxyactein erfolgreich validiert werden. Vorab durchgeführte Toxizitätsversuche zeigten, dass der Gesamtextrakt in keiner Weise toxisch auf die Caco-Zellen wirkte.

Anhand des Permeabilitätsassay konnte für 27-Deoxyactein ein Papp-Wert von A → B von $10,6 \times e^{-6}$ bzw. $9,2 \times e^{-6}$ in den Extrakten C001 und C005 ermittelt werden. Die Transporte wurden ebenso in umgekehrter Richtung durchgeführt, dabei wurde bei C001 ein Papp-Wert von $17,4 \times e^{-6}$ und bei C005 von $21,3 \times e^{-6}$ für 27-Deoxyactein berechnet. Die errechnete Efflux-Ratio, die einen Aufschluss auf den Transportmechanismus zulässt, ergab im Mittel einen Wert von 2, woraus man auf die aktive Sekretion der Substanz schließen kann.

Nach der Identifizierung von N ω -Methylserotonin in *A. racemosa* wurde im dritten pharmakologischen Teil der Arbeit in einem zellbasierten funktionellen Bindungsassay untersucht, inwiefern der Gehalt von N ω -Methylserotonin in unterschiedlichen Drogenchargen mit der Bindungsaffinität an den Serotoninrezeptor 5-HT 7 und damit der Wirksamkeit der Drogenchargen korreliert. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem ermittelten Gehalt von N ω -Methylserotonin und der EC 50 aus dem Bindungsassay konnte nicht nachgewiesen werden. Vielmehr scheint das Zusammenspiel unterschiedlicher Substanzen in der Pflanze für die Wirkung verantwortlich zu sein. Der 5-HT 7 Rezeptor konnte durch diese Arbeit aber als ein Target von *Actaea racemosa* Zubereitungen identifiziert werden.

Die Traubensilberkerze gilt als eine hochpotente Arzneipflanze, deren detaillierte Erforschung noch weitere Jahre andauern wird. Durch diese Arbeit konnte eine umfassende Inhaltsstoffprofilierung sowie ein reproduzierbarer Fraktionierungsprozess erstellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Saponine aus der lipophilen Fraktion L 2 protektiv gegen Osteoporose in der Menopause wirken, während die Bestandteile der hydrophilen Fraktion H 3 spezifisch serotonerge und dopaminerge Wirkungen aufweisen und damit die zentralnervösen klimakterischen Beschwerden positiv beeinflussen. Diese Daten sowie der durchgeführte Fraktionierungsprozess könnten zukünftig dazu beitragen, hochspezifische Trockenextrakte zur Behandlung von Erkrankungen in der Menopause herzustellen.

F. Summary

Herbal medicinal products with specific extracts from rhizome and root material of black cohosh [*Actaea racemosa* L., syn.: *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt.] are widely accepted to relieve climacteric symptoms in postmenopausal women. The indication encompasses hot flushes, mental and sleep disorders, bladder diseases and prophylaxis of menopausal osteoporosis. Phytotherapeutics containing black cohosh show high evidence based efficacy with a good safety profile. This justifies black cohosh to be a promising phytotherapeutic alternative to hormone replacement therapy which is usually associated with a high risk of adverse events as well as the risk of development breast cancer.

The aim of the thesis was to explore active components and their mode of action of BNO 1055 dry extract.

In the first part the special extract BNO 1055 from black cohosh was fractionated by preparative chromatography into six subfractions which were subsequently characterised by high resolution mass spectrometry (LC/ToF-MS). Analytical data clearly prove the presence of the main triterpene glycosides acteine and 27-deoxyacteine in the lipophilic subfractions L 2 whereas cimicifugoside C, cimigenolxylopyranoside and acetylcimigenolpyranoside were present in L 3. High amounts of carbohydrates characterised H 1. The hydrophilic subfraction H 2 contained phenylpropanoic acid derivatives. N ω -methylserotonin as well as the alkaloids cimipronidine and cyclocimipronidine were identified in H 3.

Additionally in cooperation with the medical department of the Georg-August-Universität Göttingen the development of osteoporosis in ovariectomised rats was shown to be inhibited significantly by the whole extract, LF and L 2 fraction.

Further bioavailability of 27-deoxyactein was determined by using a caco-2 permeability assay. For this purpose a LC-MS quantification method was successfully validated. Preliminary toxicity test results showed no cytotoxic activity of the whole extract against caco-cells.

The permeability assay determined Papp-values of 10.6×10^{-6} and 9.20×10^{-6} respectively for 27-deoxyacteine in the extracts C001 and C005 for efflux from A to B. Papp-values of 17.4×10^{-6} and 21.3×10^{-6} respectively for 27-deoxyacteine in C001 and C005 were computed for reverse direction. The calculated efflux ratio, which suggest the preferred mechanism of transport, was 2 indicating an active secretion of 27-deoxyacteine.

In addition using a cell-based functional binding assay a distinct correlation between the content of N ω -methylserotonin and the binding affinity to the serotonin receptor 5-HT₇ in

SUMMARY

different drug batches could not be shown. This indicates that the content of N ω -methylserotonin is not solely responsible for the efficacy of black cohosh; this is rather accounted to an interaction of various components of the plant. Confirmation of the 5-HT $_7$ receptor as a target of black cohosh could be demonstrated in this study.

Black cohosh is considered to be a highly potent medicinal plant and years of further research will be needed to fully explore its broad range of efficacy in climacteric disorders. Within this thesis a complete ingredient screening and fractionation process was performed. The data showed that saponines from the lipophilic fraction L 2 are protective against osteoporosis, whereas the constituents of the hydrophilic fraction exhibit specifically serotonergic and dopaminergic actions and could therefore positively influence central nervous climacteric symptoms. These data and the fractionation process used may contribute to establish high specific and targeted dry extracts in the future.

G. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| Abb. 1 | <i>Actaea racemosa</i> - Das Kraut. Links die Pflanze; rechts oben der traubige Blütenstand; rechts unten die Blüte (Quelle: commons.wikimedia.org; Urheberrecht frei)..... | 2 |
| Abb. 2 | <i>Actaea racemosa</i> - Das Rhizom [23] | 5 |
| Abb. 3 | Strukturformeln der Inhaltsstoffe in <i>A. racemosa</i> Teil 1..... | 7 |
| Abb. 4 | Strukturformeln der Inhaltsstoffe in <i>A. racemosa</i> Teil 2..... | 8 |
| Abb. 5 | Strukturformeln der Inhaltsstoffe in <i>A. racemosa</i> Teil 3..... | 9 |
| Abb. 6 | Strukturformeln der detektierten Kohlenhydrate in <i>A. racemosa</i> | 10 |
| Abb. 7 | Grundstruktur des 9, 19 Cycloartan Typ | 11 |
| Abb. 8 | Versuchsaufbau des in vivo Rattenmodell | 35 |
| Abb. 9 | Schematischer Aufbau des Caco-2 Zellmodells [57] | 36 |
| Abb. 10 | Transwell® Polycarbonat Filtersystem. Die Beschriftung setzt sich aus dem Buchstaben für die Insertreihen und der Nummerierung der individuellen Inserts 1-4 zusammen..... | 40 |
| Abb. 11 | Zellwachstum an Tag 3 | 41 |
| Abb. 12 | Zellwachstum an Tag 19 | 41 |
| Abb. 13 | Fertig ausgebildete Monolayerschicht der Caco-2 Zelllinie am Tag 27 | 42 |
| Abb. 14 | TLC auf Saponine, Charge 0000027838, Extraktionsmittel Ethanol 58 % (V/V), Aufgetragen als 15 mm breite Banden, Referenzlösung Aescin $R_f = 0.18$ und 27-Deoxyactein $R_f = 0.7$ (A), pulverisierte Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (B), geschnittene Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (C), pulverisierte Droge 24 h Bewegungsmazeration (D), geschnittene Droge 24 h Bewegungsmazeration (E)..... | 49 |
| Abb. 15 | TLC auf Saponine, Charge 0000026867, Extraktionsmittel Ethanol 58 % (V/V), Aufgetragen als 15 mm breite Banden, Referenzlösung Aescin $R_f = 0.18$ und 27-Deoxyactein $R_f = 0.7$ (A), pulverisierte Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (B), geschnittene Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (C), pulverisierte Droge 24 h Bewegungsmazeration (D), geschnittene Droge 24 h Bewegungsmazeration (E)..... | 50 |
| Abb. 16 | TLC auf Saponine, Charge 0000026766, Extraktionsmittel Ethanol 58 % (V/V), Aufgetragen als 15 mm breite Banden, Referenzlösung Aescin $R_f = 0.18$ und 27-Deoxyactein $R_f = 0.7$ (A), pulverisierte Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (B), geschnittene Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (C), pulverisierte Droge 24 h Bewegungsmazeration (D), geschnittene Droge 24 h Bewegungsmazeration (E)..... | 50 |
| Abb. 17 | TLC auf Saponine, Charge 0000027838, Extraktionsmittel 2-Propanol 40 % (V/V), Aufgetragen als 15 mm breite Banden, Referenzlösung Aescin $R_f = 0.18$ und 27-Deoxyactein $R_f = 0.7$ (A), pulverisierte Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (B), geschnittene Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (C), pulverisierte Droge 24 h Bewegungsmazeration (D), geschnittene Droge 24 h Bewegungsmazeration (E)..... | 52 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|---------|---|----|
| Abb. 18 | TLC auf Saponine, Charge 0000026867, Extraktionsmittel 2-Propanol 40 % (V/V), Aufgetragen als 15 mm breite Banden, Referenzlösung Aescin $R_f = 0.18$ und 27-Deoxyactein $R_f = 0.7$ (A), pulverisierte Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (B), geschnittene Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (C), pulverisierte Droge 24 h Bewegungsmazeration (D), geschnittene Droge 24 h Bewegungsmazeration (E)..... | 52 |
| Abb. 19 | TLC auf Saponine, Charge 0000026766, Extraktionsmittel 2-Propanol 40 % (V/V), Aufgetragen als 15 mm breite Banden, Referenzlösung Aescin $R_f = 0.18$ und 27-Deoxyactein $R_f = 0.7$ (A), pulverisierte Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (B), geschnittene Droge 30 min unter Rückfluss extrahiert (C), pulverisierte Droge 24 h Bewegungsmazeration (D), geschnittene Droge 24 h Bewegungsmazeration (E)..... | 52 |
| Abb. 20 | HPLC-DAD-Chromatogramm der Gehaltsbestimmung der Isoferulasäure | 54 |
| Abb. 21 | HPLC-ELSD-Chromatogramm der Gehaltsbestimmung der Saponine in <i>Actaea rhizoma</i> | 54 |
| Abb. 22 | Überblick über den Fraktionierungsprozess des Spezialextraktes BNO 1055 | 55 |
| Abb. 23 | TLC Kontrolle der LLE von BNO 1055 und deren lipophilen und hydrophilen Fraktionen..... | 55 |
| Abb. 24 | LC-MS Chromatogramme des Gesamtextraktes (CR), der lipophilen Fraktion (LF) und der hydrophilen Fraktion (HF): DAD-Signal CR (A), MS-positiv CR (B), MS-negativ CR (C), DAD-Signal LF (D), MS-positiv LF (E), MS-negativ LF (F), DAD-Signal HF (G), MS-positiv HF (H), MS-negativ HF (I)..... | 57 |
| Abb. 25 | TLC-Kontrolle der ersten Subfraktionierung der lipophilen Fraktion aufgenommen bei 366 nm nach Derivatisierung in modifiziertem Anisaldehyd. Aufgetragen ist jede 5te gesammelte Fraktion. Die einzelnen Unterfraktionen sind farblich markiert..... | 58 |
| Abb. 26 | TLC-Kontrolle der zweiten Subfraktionierung der lipophilen Fraktion aufgenommen bei 366 nm nach Derivatisierung in modifiziertem Anisaldehyd. Aufgetragen ist jede 5te gesammelte Fraktion. Die einzelnen Unterfraktionen sind farblich markiert..... | 58 |
| Abb. 27 | TLC-Kontrolle der ersten Subfraktionierung der hydrophilen Fraktion aufgenommen bei Tageslicht und bei 366 nm nach Derivatisierung in modifiziertem Anisaldehyd. Aufgetragen ist jede 5te gesammelte Fraktion. Zur besseren Erkennung der Schnittpunkte der H3 Fraktion wurde diese Platte bei 366 nm aufgenommen. Die einzelnen Unterfraktionen sind farblich markiert..... | 59 |
| Abb. 28 | TLC-Kontrolle der zweiten Subfraktionierung der hydrophilen Fraktion aufgenommen bei Tageslicht und bei 366 nm nach Derivatisierung in modifiziertem Anisaldehyd. Aufgetragen ist jede 5te gesammelte Fraktion. Zur besseren Erkennung der Schnittpunkte der H3 Fraktion wurde diese Platte bei 366 nm aufgenommen. Die einzelnen Unterfraktionen sind farblich markiert..... | 59 |
| Abb. 29 | HPLC-Methode 01 DAD-Chromatogram bei 330 nm. Signalzuweisung: H1-Fraktion (grün), H2-Fraktion (rot), H3-Fraktion (blau) | 60 |
| Abb. 30 | HPLC-Methode 04 positives APCI Signal. Signalzuweisung: L1-Fraktion (grün), L2-Fraktion (rot), L3-Fraktion (blau)..... | 61 |
| Abb. 31 | HPLC-Methode 03 ELSD Signal. Signalzuweisung: L1-Fraktion (grün), L2-Fraktion (rot), L3-Fraktion (blau)..... | 61 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|---------|---|-----|
| Abb. 32 | Extrahierte Ionenspuren der hydrophilen Bestandteile von BNO 1055 aus <i>Actaea racemosa</i> rhizoma aufgenommen mittels LC/ToF-MS. Die Signalzuweisung erfolgte anhand der nummerierten Strukturformeln in Kapitel A.1.6 unter Zuhilfenahme von Literaturdaten | 62 |
| Abb. 33 | Extrahierte Ionenspuren der lipophilen Bestandteile von BNO 1055 aus <i>Actaea racemosa</i> rhizoma aufgenommen mittels LC/ToF-MS. Die Signalzuweisung erfolgte anhand der nummerierten Strukturformeln in Kapitel A.1.6 unter Zuhilfenahme von Literaturdaten. | 63 |
| Abb. 34 | HPLC-ELSD Chromatogramm der HPLC-Methode 03 von BNO 1055 C001 (blau) und BNO 1055 C005 (rot) | 68 |
| Abb. 35 | HPLC-ELSD Chromatogramm der HPLC-Methode 03 von C001/LF (blau) und C005/LF (rot) | 69 |
| Abb. 36 | HPLC-ELSD Chromatogramm der HPLC-Methode 03 von C001/L1 (blau) und C005/L1 (rot)..... | 69 |
| Abb. 37 | HPLC-ELSD Chromatogramm der HPLC-Methode 03 von C001/L2 (blau) und C005/L2 (rot)..... | 70 |
| Abb. 38 | HPLC-ELSD Chromatogramm der HPLC-Methode 03 von C001/L3 (blau) und C005/L3 (rot)..... | 70 |
| Abb. 39 | qCT Messungen der Spongiosadichte der Tibia, aufgezeigt sind die Ergebnisse der lipophilen Fraktionen, hier anstatt L-Fraktionen als S-Fraktionen benannt..... | 74 |
| Abb. 40 | qCT Messungen der Spongiosadichte der Tibia, aufgezeigt sind die Ergebnisse der hydrophilen Fraktionen, hier anstatt H-Fraktionen als R-Fraktionen benannt..... | 75 |
| Abb. 41 | Löslichkeit von C001 in Ethanol 50 % (m/m)..... | 76 |
| Abb. 42 | Löslichkeit von C001 in FaSSIF-Puffer, Schaumbildung aufgrund des hohen Lipidgehalts des FaSSIF-Puffers | 77 |
| Abb. 43 | Gehalt an 27-Deoxyactein in den Löslichkeitsversuchen von C001, Werte angegeben in µg/L | 78 |
| Abb. 44 | Vergleich der Gehalte an 27-Deoxyactein in C001 und C005 einer 2 g/L Lösung extrahiert in Ethanol 50 % (m/m) und apikaler Pufferlösung (FaSSIF), Werte angegeben in µg/L | 78 |
| Abb. 45 | Kalibrationskurve Validierungscharge V01 | 82 |
| Abb. 46 | Kalibrationskurve Validierungscharge V02 | 83 |
| Abb. 47 | Kalibrationskurve Validierungscharge V03 | 84 |
| Abb. 48 | Kalibrationskurve Validierungscharge V04 | 85 |
| Abb. 49 | XIC des LLOQ bei m/z 683,3780 $[M+Na]^+$ (A), XIC des ULOQ bei m/z 683,3780 $[M+Na]^+$ (B) | 86 |
| Abb. 50 | XIC des ULOQ bei m/z 683,3780 $[M+Na]^+$ (A); XIC des nachfolgenden Double Blank bei m/z 683,3780 (B)..... | 88 |
| Abb. 51 | Aufnahme der Monolayerschicht am Ende des Transportversuches mit 0.2 g/L C001 in FaSSIF | 100 |
| Abb. 52 | Aufnahme der Monolayerschicht am Ende des Transportversuches mit 0.5 g/L C001 in FaSSIF | 100 |
| Abb. 53 | Aufnahme der Monolayerschicht am Ende des Transportversuches mit 1 g/L C001 in FaSSIF | 101 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|---------|--|-----|
| Abb. 54 | Transportversuche mit Zusatz von 4 % BSA basolateral | 103 |
| Abb. 55 | Transportversuch ohne Zusatz von 4 % BSA basolateral | 103 |
| Abb. 56 | Transportwege an einer epithelialen Barriere: 1 = transzellulär; 2 = parazellulär; 3 = Transporter-vermittelt; 4 = vesikulär; 5 = apikales Efflux System [72] | 105 |
| Abb. 57 | A → B Transport von 27-Deoxyactein in C001 und C005 | 105 |
| Abb. 58 | B → A Transport von 27-Deoxyactein in C001 und C005 | 106 |
| Abb. 59 | AB-Transport: Chromatogramm des Gesamtextraktes zum Zeitpunkt T ₀ (A); Chromatogramm des Gesamtextraktes zum Zeitpunkt T ₃₀₀ (B)..... | 107 |
| Abb. 60 | BA-Transport: Chromatogramm des Gesamtextraktes zum Zeitpunkt T ₀ (A); Chromatogramm des Gesamtextraktes zum Zeitpunkt T ₃₀₀ (B)..... | 107 |
| Abb. 61 | Dosis-Wirkungskurve der Positiv- (N ω -Methylserotonin) und Negativkontrolle (Ethanol), dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Wiederholungsmessungen | 109 |
| Abb. 62 | Vergleich der Dosis-Wirkungskurven von N ω -Methylserotonin und C001, dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils 3 Wiederholungsmessungen | 110 |
| Abb. 63 | Ergebnisse des funktionellen Ligandenbindungsassay, N = 90, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD | 111 |
| Abb. 64 | Kalibriergerade N ω -Methylserotonin..... | 112 |
| Abb. 65 | XIC m/z 160,0757 \pm 0,02 N ω -Methylserotonin CAL-5 (A), XIC m/z 160,0757 \pm 0,02 C001 (B), Fragmentspektrum N ω -Methylserotonin (C)..... | 113 |

H. Tabellenverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| Tab. 1 | Auflistung der verwendeten Drogenchargen mit dem Herkunftsland und dem Erntezeitpunkt | 17 |
| Tab. 2 | Übersicht über die eingenommene Futtermenge der Versuchstiere und die dadurch resultierende Substanzaufnahme im Durchschnitt pro Tier pro Tag | 34 |
| Tab. 3 | 27-Deoxyactein Konzentration in den FaSSIF Stammlösungen der beiden BNO 1055 Spezialextrakte C001 und C005 in µg/L | 38 |
| Tab. 4 | Zusammensetzung der physiologischen Transportlösung HBSS („Hanks´ Balanced Salt Solution“) in mg/ L (Produktinformation Biochrom) | 39 |
| Tab. 5 | Gehalt an Isoferulasäure in gepulverter und geschnittener Droge in ethanolischer Lösung. Gegenüberstellung der beiden Extraktionsverfahren, 30 min bei 90 °C und 24 h Bewegungsmazeration bei RT | 51 |
| Tab. 6 | Gehalt an Saponinen in gepulverter und geschnittener Droge in ethanolischer Lösung. Gegenüberstellung der beiden Extraktionsverfahren, 30 min bei 90 °C und 24 h Bewegungsmazeration bei RT | 51 |
| Tab. 7 | Gehalt an Isoferulasäure in gepulverter und geschnittener Droge in isopropanolischer Lösung. Gegenüberstellung der beiden Extraktionsverfahren, 30 min bei 90 °C und 24 h Bewegungsmazeration bei RT | 53 |
| Tab. 8 | Gehalt an Saponinen in gepulverter und geschnittener Droge in isopropanolischer Lösung. Gegenüberstellung der beiden Extraktionsverfahren, 30 min bei 90 °C und 24 h Bewegungsmazeration bei RT | 53 |
| Tab. 9 | Inhaltsstoffe der Fraktion H1 | 64 |
| Tab. 10 | Inhaltsstoffe der Fraktion H2 | 64 |
| Tab. 11 | Inhaltsstoffe der Fraktion H3 | 65 |
| Tab. 12 | Inhaltsstoffe der Fraktion L1 | 65 |
| Tab. 13 | Inhaltsstoffe der Fraktion L2 | 65 |
| Tab. 14 | Inhaltsstoffe der Fraktion L3 | 66 |
| Tab. 15 | Gesamtübersicht der Inhaltsstoffe in <i>A. racemosa</i> | 67 |
| Tab. 16 | Gehaltsbestimmung der Gesamtheit der Saponine in C001 und C005 sowie deren Unterfraktionen, gemessen mit der HPLC-Methode 03. Detektion: ELSD. Gehalte sind angegeben in mg/100 mg Trockenextrakt | 71 |
| Tab. 17 | Gravimetrische Analyse der Fraktionen von BNO 1055 C001 und C005 | 72 |
| Tab. 18 | Kalibrierfunktion und Regressionsparameter | 86 |
| Tab. 19 | Blank und Nullprobe, Verschleppungen: | 87 |
| Tab. 20 | Richtigkeit und Präzision der LLOQ-Proben | 89 |
| Tab. 21 | Between-Run Analyse der LLOQ-Proben | 89 |
| Tab. 22 | Within run Analyse der LLOQ-Proben | 90 |
| Tab. 23 | Richtigkeit und Präzision der QC-A Proben | 90 |
| Tab. 24 | Between-Run Analyse der QC-A Proben | 90 |
| Tab. 25 | Within-Run Analyse der QC-A Proben | 90 |
| Tab. 26 | Richtigkeit und Präzision der QC-B Proben | 91 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | | |
|---------|--|-----|
| Tab. 27 | Between-Run Analyse der QC-B Proben..... | 91 |
| Tab. 28 | Within Run Analyse der QC-B Proben..... | 91 |
| Tab. 29 | Richtigkeit und Präzision der QC-C Proben..... | 92 |
| Tab. 30 | Between-Run Analyse der QC-C Proben..... | 92 |
| Tab. 31 | Within Run Analyse der QC-C Proben..... | 92 |
| Tab. 32 | Auswertung der zeitlichen Messstabilität | 93 |
| Tab. 33 | Selektivität der Matrices auf den Analyten..... | 95 |
| Tab. 34 | Selektivität der Matrices auf den internen Standard IS..... | 95 |
| Tab. 35 | Wiederfindung des Analyten in den unterschiedlichen Matrices | 96 |
| Tab. 36 | Ergebnisse der Wiederfindungsanalyse Validierungscharge V01 | 97 |
| Tab. 37 | Ergebnisse der Wiederfindungsanalyse Validierungscharge V02 | 97 |
| Tab. 38 | Ergebnisse der Wiederfindungsanalyse Validierungscharge V03 | 98 |
| Tab. 39 | Ergebnisse der Wiederfindungsanalyse Validierungscharge V04 | 98 |
| Tab. 40 | Ergebnisse der Matrix Effekte auf die Genauigkeit der Messmethode..... | 99 |
| Tab. 41 | Ermittlung des Teer-Wertes | 99 |
| Tab. 42 | Efflux Ratio, ermittelt aus den Papp-Werten, von C001 und C005..... | 104 |
| Tab. 43 | Übersicht über die Ergebnisse der Nω-Methylserotonin Gehaltsbestimmung | 114 |
| Tab. 44 | Gesamtgehalt an Zimtsäurederivaten in gepulverter und geschnittener Droge in ethanolischer und isopropanolischer Lösung mit den jeweiligen Extraktionsverfahren, 30 min bei 90 °C und 24 h Bewegungsmazeration bei RT .. | 120 |
| Tab. 45 | Gesamtgehalt an Saponinen in gepulverter und geschnittener Droge in ethanolischer und isopropanolischer Lösung mit den jeweiligen Extraktionsverfahren, 30 min bei 90 °C und 24 h Bewegungsmazeration bei RT | 120 |
| Tab. 46 | Transportmechanismus durch Bestimmung der Efflux ratio | 126 |

I. Literaturverzeichnis

1. Prendy, M.L.D.A., Patricia; Chaimberlain, James L. , *Black Cohosh Actaea racemosa: an annotated bibliography*. Gen. Tech. Rep. SRS 97; Asheville, NC: U.S. Departement fo Agriculture Forest Service, Southern Research Station, 2006. **99 p.**
2. Ersfeld, A., Hahn, G., *Cimicifuga racemosa: Traubensilberkerze*. Naturheilpraxis, 1990. **11**: p. 1218 - 1227.
3. Stiegele, A., *In: Klinische Homöopathie*. Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1948. **19**: p. 223, 227, 232.
4. Bradley, P.R., *British Herbal Compedium*. 1992: British Herbal Medicine Association.
5. Madaus G., *Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Abteilung I: Heilpflanzen*. 1938, Leipzig: Thieme.
6. <http://www.pflueger.de/homoeopathische-komplexmittel-von-pflueger/wissenswertes-zur-homoeopathie/pflanzendatenbank/details/pflanze/cimicifuga-racemosa.html>.
7. Viereck, V., G. Emons, and W. Wuttke, *Black cohosh: just another phytoestrogen?* Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(5): p. 214-21.
8. Kim, E.Y., Y.J. Lee, and M.R. Rhyu, *Black cohosh (Cimicifuga racemosa) relaxes the isolated rat thoracic aorta through endothelium-dependent and -independent mechanisms*. J Ethnopharmacol, 2011. **138**(2): p. 537-42.
9. Winterhoff, H., et al., *Cimicifuga extract BNO 1055: reduction of hot flushes and hints on antidepressant activity*. Maturitas, 2003. **44 Suppl 1**: p. S51-8.
10. Winterhoff, H., et al., *[Pharmacologic and clinical studies using Cimicifuga racemosa in climacteric complaints]*. Wien Med Wochenschr, 2002. **152**(15-16): p. 360-3.
11. Amsterdam, J.D., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Cimicifuga racemosa (black cohosh) in women with anxiety disorder due to menopause*. J Clin Psychopharmacol, 2009. **29**(5): p. 478-83.
12. Nappi, R.E., et al., *Efficacy of Cimicifuga racemosa on climacteric complaints: a randomized study versus low-dose transdermal estradiol*. Gynecol Endocrinol, 2005. **20**(1): p. 30-5.
13. Pepping, J., *Black cohosh: Cimicifuga racemosa*. Am J Health Syst Pharm, 1999. **56**(14): p. 1400-2.
14. Wuttke, W., D. Seidlova-Wuttke, and C. Gorkow, *The Cimicifuga preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers*. Maturitas, 2003. **44 Suppl 1**: p. S67-77.
15. Seidlova-Wuttke, D., et al., *Pharmacology of Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus*. Maturitas, 2003. **44 Suppl 1**: p. S39-50.
16. Jarry, H. and G. Harnischfeger, *Studies on the endocrine effects of the contents of Cimicifuga racemosa*. Planta Med, 1985. **51**(1): p. 46-49.
17. Lieberman, S., *A review of the effectiveness of Cimicifuga racemosa (black cohosh) for the symptoms of menopause*. J Womens Health, 1998. **7**(5): p. 525-9.
18. Duker, E.M., et al., *Effects of extracts from Cimicifuga racemosa on gonadotropin release in menopausal women and ovariectomized rats*. Planta Med, 1991. **57**(5): p. 420-4.
19. Blaschek W., E.S., Hackenthal E., Holzgrabe U., Keller K., Reichling J., Schulz V.,, *HagerRom DVD 2011, Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*. 2011: Springer-Verlag.
20. Wichtl M., *Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage*. 2002: deutscher Apotheker Verlag.

LITERATURVERZEICHNIS

21. Hänsel, R., et al., *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Vol. 7. Auflage. 2003: Springer Verlag. 1214.
22. Nultsch W., *Allgemeine Botanik*. 2001: Thieme.
23. Buscell, P. 2011; Available from:
<http://www.plexusinstitute.org/blogpost/656763/127604/The-Rhizome-the-Classroom-the-Community>.
24. Agency, E.M., *Guideline on good agricultural and collection practice (GACP) for starting materials of herbal origin*. 2006.
25. Schuh, M.I., D.; Abel, G.; Blaschek, W., *The detailed chemical characterisation of the special extract BNO 1055 from Actaea racemosa L.* In preparation, 2013.
26. Krösbacher S. A., *Charakterisierung eines Cimicifuga racemosa Trockenextraktes unter Verwendung instrumentalanalytischer und nasschemischer Methoden*. Diplomarbeit Universität Innsbruck, 2007.
27. Nuntanakorn, P., et al., *Polyphenolic constituents of Actaea racemosa*. J Nat Prod, 2006. **69**(3): p. 314-8.
28. Stromeier, S., F. Peterleit, and A. Nahrstedt, *Phenolic esters from the rhizomes of Cimicifuga racemosa do not cause proliferation effects in MCF-7 cells*. Planta Med, 2005. **71**(6): p. 495-500.
29. Chen, S.N., et al., *Cimiracemates A-D, phenylpropanoid esters from the rhizomes of Cimicifuga racemosa*. Phytochemistry, 2002. **61**(4): p. 409-13.
30. He, K., et al., *Cimicifuga species identification by high performance liquid chromatography-photodiode array/mass spectrometric/evaporative light scattering detection for quality control of black cohosh products*. J Chromatogr A, 2006. **1112**(1-2): p. 241-54.
31. Lai, G.F., et al., *Triterpenoid glycoside from Cimicifuga racemosa*. J Asian Nat Prod Res, 2005. **7**(5): p. 695-9.
32. Chen, S.N., et al., *Isolation, structure elucidation, and absolute configuration of 26-deoxyactein from Cimicifuga racemosa and clarification of nomenclature associated with 27-deoxyactein*. J Nat Prod, 2002. **65**(4): p. 601-5.
33. Shao, Y., et al., *Triterpene glycosides from Cimicifuga racemosa*. J Nat Prod, 2000. **63**(7): p. 905-10.
34. Fabricant, D.S., et al., *Cimipronidine, a cyclic guanidine alkaloid from Cimicifuga racemosa*. J Nat Prod, 2005. **68**(8): p. 1266-70.
35. Powell, S.L., et al., *In vitro serotonergic activity of black cohosh and identification of N(omega)-methylserotonin as a potential active constituent*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(24): p. 11718-26.
36. Godecke, T., et al., *Guanidine alkaloids and Pictet-Spengler adducts from black cohosh (Cimicifuga racemosa)*. J Nat Prod, 2009. **72**(3): p. 433-7.
37. Brenner, P.F., *The menopausal syndrome*. Obstet Gynecol, 1988. **72**(5 Suppl): p. 6S-11S.
38. (IQWiG), I.f.Q.a.E.i.H.C. (2012) *fact sheet: Menopause*.
39. Avis, N.E., et al., *Is there a menopausal syndrome? Menopausal status and symptoms across racial/ethnic groups*. Soc Sci Med, 2001. **52**(3): p. 345-56.
40. <http://bionorica.de/gynaekologie/klimadynon@-uno/krankheitsbilder-bei-beschwerden-in-den-wechseljahren.html>.
41. Jarry, H., et al., *In vitro effects of the Cimicifuga racemosa extract BNO 1055*. Maturitas, 2003. **44 Suppl 1**: p. S31-8.
42. Seidlova-Wuttke, D., et al., *Cimicifuga racemosa and its triterpene-saponins prevent the Metabolic Syndrome and deterioration of cartilage in the knee joint of ovariectomized rats by similar mechanisms*. Phytomedicine, 2012. **19**(8-9): p. 846-53.

LITERATURVERZEICHNIS

43. Seidlova-Wuttke, D., H. Jarry, and W. Wuttke, *Effects of estradiol benzoate, raloxifen and an ethanolic extract of Cimicifuga racemosa in nonclassical estrogen regulated organs of ovariectomized rats*. *Planta Med*, 2009. **75**(12): p. 1279-85.
44. Burdette, J.E., et al., *Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor*. *J Agric Food Chem*, 2003. **51**(19): p. 5661-70.
45. Laß, L., *Antiosteoporotische Prinzipien in Cimicifuga racemosa BNO 1055/C001 und ihren Fraktionen*. 2011.
46. Fogh, J., M. Fogh, and T. Orfeo, *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice.*, in *J Natl Cancer INst*. 1977. p. 221-226.
47. Artursson, P. and J. Karlsson, *Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells.*, in *Biochem. Biophys. Re.Comm*. 1991. p. 880-885.
48. Artursson, P. and C. Magnusson, *Epithelial transport of drugs in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells.*, in *J Pharm Sci*. 1990. p. 595-600.
49. Hilgers, A.R., R.A. Conradi, and P.S. Burton, *Caco-2 Cell Monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa.*, in *Pharm Res*. 1990. p. 902-910.
50. Balimane, P.V., Y.H. Han, and S. Chong, *Current Industrial Practices of Assessing Permeability and P-Glycoprotein Interaction.*, in *The AAPS Journal*. 2006. p. E1-E12.
51. Artursson, P., *Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa.*, in *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1991. p. 305-330.
52. Rubas, W., M. Cromwell, and Z.e.a. Shakhkrokh, *Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue.*, in *J Pharm Sci*. 1996. p. 165-169.
53. van Breemen, R.B. and Y. Li, *Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption.*, in *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*. 2005. p. 175-185.
54. Chantret, I., et al., *Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: A Survey of Twenty Cell Lines.*, in *Cancer Research*. 1998. p. 1936-1942.
55. Artursson, P., K. Palm, and K. Luthman, *Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport.*, in *Adv Drug Deliv Rev*. 2001. p. 27-43.
56. Potthast, H., *Bewertung von Arzneistoffen und Fertigarzneimitteln auf der Grundlage des Biopharmazeutischen Klassifizierungssystems (BCS) an ausgewählten Beispielen - Eignung des Caco-2 Modells und Konzeption einer Datenbank*. 2002, Universität Heidelberg.
57. ; Available from: <http://www.xenoblis.com/services/absorption/caco-2-permeability/>.
58. Amidon, G.L., et al., *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability.*, in *Pharm Res*. 1995. p. 413-419.
59. FDA, *Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms containing certain active moieties/active ingredients based on a Biopharmaceutics Classification System*. 2000, CDER/FDA.
60. Langguth, P., G. Fricker, and H. Wunderli-Allenspach, *Biopharmazie*. 2004, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
61. Cattoor, K., et al., *Transport of hop bitter acids across intestinal Caco-2 cell monolayers*. *J Agric Food Chem*, 2010. **58**(7): p. 4132-40.
62. Ingels, F., et al., *Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model*. *Int J Pharm*, 2002. **232**(1-2): p. 183-92.

LITERATURVERZEICHNIS

63. Adham, N., et al., *Functional characterization of the recombinant human 5-hydroxytryptamine_{7(a)} receptor isoform coupled to adenylate cyclase stimulation*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **287**(2): p. 508-14.
64. Seidlova-Wuttke, D., et al., *Osteoprotective effects of Cimicifuga racemosa and its triterpene-saponins are responsible for reduction of bone marrow fat*. Phytomedicine, 2012. **19**(10): p. 855-60.
65. Kammann, M., *Black Cohosh and the protective effect on bone metabolism as measured by computed tomography in ovariectomized rats*. GA Congress, Antalya 2011, 2011.
66. FDA, *Bioanalytical method validation*. 2001.
67. Agency, E.M., *Guideline on bioanalytical method validation EMEA/CHMP/EWP/192217/2009*. 2011.
68. Danloy, S., et al., *Effects of alpha-hederin, a saponin extracted from Hedera helix, on cells cultured in vitro*. Planta Med, 1994. **60**(1): p. 45-9.
69. Kataoka, M., et al., *Effekt of Food Intake on the Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs: In Vitro Assessment of Drug Dissolution and Permeation Assay System.*, in *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006. p. 2051-2061.
70. Krishna, G., et al., *Permeability of lipophilic compounds in drug discovery using in-vitro human absorption model, Caco-2.*, in *International Journal of Pharmaceutics*. 2001. p. 77-89.
71. Saha, P. and J.H. Kou, *Effect of bovine serum albumin on drug permeability estimation across Caco-2 monolayers.*, in *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2002. p. 319-324.
72. Kühn, A. (2013) *Transport über epitheliale Monolayer Aufbaupraktikum - Biowissenschaften für Bioinformatiker*.
73. Mengod, G., et al., *5-HT receptors in mammalian brain: receptor autoradiography and in situ hybridization studies of new ligands and newly identified receptors*. Histochem J, 1996. **28**(11): p. 747-58.
74. Lucchelli, A., et al., *The interaction of antidepressant drugs with enteric 5-HT₇ receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(3): p. 284-9.
75. Roth, B.L., et al., *Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **268**(3): p. 1403-10.
76. Hedlund, P.B. and J.G. Sutcliffe, *Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(9): p. 481-6.
77. Raus, K., et al., *First-time proof of endometrial safety of the special black cohosh extract (Actaea or Cimicifuga racemosa extract) CR BNO 1055*. Menopause, 2006. **13**(4): p. 678-91.
78. Borrelli, F. and E. Ernst, *Black cohosh (Cimicifuga racemosa) for menopausal symptoms: a systematic review of its efficacy*. Pharmacol Res, 2008. **58**(1): p. 8-14.
79. Firenzuoli, F., L. Gori, and P. Roberti di Sarsina, *Black Cohosh Hepatic Safety: Follow-Up of 107 Patients Consuming a Special Cimicifuga racemosa rhizome Herbal Extract and Review of Literature*. Evid Based Complement Alternat Med, 2011. **2011**: p. 821392.
80. Hernandez Munoz, G. and S. Pluchino, *Cimicifuga racemosa for the treatment of hot flashes in women surviving breast cancer*. Maturitas, 2003. **44 Suppl 1**: p. S59-65.
81. Jarry, H., G. Harnischfeger, and E. Duker, *Studies on the endocrine effects of the contents of Cimicifuga racemosa 2. In vitro binding of compounds to estrogen receptors*. Planta Med, 1985. **51**(4): p. 316-319.
82. Jarry, H., et al., *Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 inhibits proliferation of the human prostate cancer cell line LNCaP*. Phytomedicine, 2005. **12**(3): p. 178-82.

LITERATURVERZEICHNIS

83. Godecke, T., et al., *Phytochemistry of cimicifugic acids and associated bases in Cimicifuga racemosa root extracts*. Phytochem Anal, 2009. **20**(2): p. 120-33.
84. Chedraui, P., et al., *Menopausal symptoms and associated risk factors among postmenopausal women screened for the metabolic syndrome*. Arch Gynecol Obstet, 2007. **275**(3): p. 161-8.
85. McKinlay, S.M. and M. Jefferys, *The menopausal syndrome*. Br J Prev Soc Med, 1974. **28**(2): p. 108-15.
86. Moravec, C.L. and M.E. Moravec, *Low-dosage estrogen-androgen in the management of the menopausal syndrome and other estrogen deficiency states*. N Y State J Med, 1955. **55**(19): p. 2775-80.
87. Saletu, B., et al., *Hormone replacement therapy and vigilance: double-blind, placebo-controlled EEG-mapping studies with an estrogen-progestogen combination (Climodien, Lafamme) versus estrogen alone in menopausal syndrome patients*. Maturitas, 2002. **43**(3): p. 165-81.
88. Holte, A. and A. Mikkelsen, *The menopausal syndrome: a factor analytic replication*. Maturitas, 1991. **13**(3): p. 193-203.
89. Radowicki, S., et al., *[Effectiveness and safety of the treatment of menopausal syndrome with Cimicifuga racemosa dry extract]*. Ginekol Pol, 2006. **77**(9): p. 678-83.
90. Wuttke, W., et al., *Phytoestrogens for hormone replacement therapy?* J Steroid Biochem Mol Biol, 2002. **83**(1-5): p. 133-47.
91. Wuttke, W., et al., *The non-estrogenic alternative for the treatment of climacteric complaints: Black cohosh (Cimicifuga or Actaea racemosa)*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013.
92. Sekiya, I., et al., *Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs)*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(2): p. 256-64.
93. Tanaka, T., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15924-9.
94. Boyce, B.F., Z. Yao, and L. Xing, *Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009. **19**(3): p. 171-80.
95. Kanzer, J., et al., *In-vitro permeability screening of melt extrudate formulations containing poorly water-soluble drug compounds using the phospholipid vesicle-based barrier*. J Pharm Pharmacol, 2010. **62**(11): p. 1591-8.
96. Fricker, G., et al., *Phospholipids and Lipid-Based Formulations in Oral Drug Delivery*, in *Pharm Res*. 2010. p. 1469-1486.
97. Czogalla, A., *Oral cyclosporine A-the current picture of its liposomal and other delivery systems*, in *Cell Mol Biol Lett*. 2009. p. 139-52.
98. Hüsck, J., *Phospholipid-Formulierungen in der antiinflammatorischen Therapie I: Strukturaufklärung der NSAR/PL-Komplexe und II: Erhöhung der oralen Absorption von Boswelliasäureextrakt*, in *Departement of Biochemie, Chemie and Pharmacy*. 2012, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main: Frankfurt.
99. Carlson, R.P., et al., *Sirolimus (rapamycin, Rapamune) and combination therapy with cyclosporin A in the rat developing adjuvant arthritis model: correlation with blood levels and the effects of different oral formulations*, in *Inflamm Res*. 1998. p. 339-44.
100. Galia, E., et al., *Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of Class I and II drugs*, in *Pharm. Res*. 1998. p. 698-705.
101. Schwebel, H.J., et al., *The apparent solubilizing capacity of simulated intestinal fluids for poorly water-soluble drugs*, in *Pharmaceutical Development and Technology*. 2010. p. 1-9.
102. Reis, S., et al., *β -blockers and benzodiazepines location in SDS and bile salt micellar systems. An ESR study*, in *J Pharm Biomed Anal*. 2007. p. 62-69.

LITERATURVERZEICHNIS

103. Aungst, B.J., *Intestinal permeation enhancers.*, in *J. Pharm. Sci.* 2000. p. 429-442.
104. Aungst, B.J., et al., *The influence of donor and reservoir additives on Caco-2 cell permeability and secretory transport of HIV inhibitors and other lipophilic compounds.*, in *Pharm. Res.* 2000. p. 1175-1180.
105. Shah, R.B., A. Palamakula, and M.A. Khan, *Cytotoxicity evaluation of enzyme inhibitors and absorption enhancers in Caco-2 cells for oral delivery of salmon calcitonin.*, in *J. Pharm. Sci.* 2004. p. 1070-1078.
106. Ingels, F.M. and P.F. Augustijns, *Biological, pharmaceutical and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system Caco-2.*, in *J. Pharm. Sci.* 2003. p. 1545-1558.
107. Gauthier, C., et al., *Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins.* Bioorg Med Chem, 2009. **17**(5): p. 2002-8.
108. Nalbantsoy, A., et al., *Biological Activities of Cycloartane-type Triterpenes from Astragalus species.* Planta Med, 2011. **77**(05): p. P_102.
109. Bock, U., T. Flototto, and E. Haltner, *Validation of cell culture models for the intestine and the blood-brain barrier and comparison of drug permeation.* ALTEX, 2004. **21 Suppl 3**: p. 57-64.
110. *Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence; CPMP/EWP/QWP/1401/98 (EMEA).*
111. Intelmann, D.G.-E.-S., 6020 Innsbruck, AT), Schuh, Markus (Rilkestrasse 15, 90419 Nürnberg, DE), Stecher, Guenther (Oberer Feldweg 30, 6091 Götzens, AT), Abel, Gudrun (Veilchenweg 5, 91301 Forchheim, DE), Jakob, Franz (Adalbert-Stifter-Weg 6, 97082 Würzburg, DE), Ebert, Regina (Dürerweg 1, 97241 Bergtheim, DE), Wuttke, Wolfgang (Domäne 8, 37120 Bovenden, DE), Seidlovà-wuttke, Dana (Domäne 8, 37120 Bovenden, DE),, *European Patent Application EP2545932: Selected cimicifuga fractions for treating osteoporosis.* 2013, Bionorica, SE (Kerschensteinerstrasse 11 - 15, 92318 Neumarkt, DE).
112. Hedlund, P.B., et al., *8-OH-DPAT acts on both 5-HT1A and 5-HT7 receptors to induce hypothermia in rodents.* Eur J Pharmacol, 2004. **487**(1-3): p. 125-32.
113. Bard, J.A., et al., *Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase.* J Biol Chem, 1993. **268**(31): p. 23422-6.
114. Plassat, J.L., N. Amlaiky, and R. Hen, *Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase.* Mol Pharmacol, 1993. **44**(2): p. 229-36.
115. Cicek, S.S., et al., *Bioactivity-guided isolation of GABA(A) receptor modulating constituents from the rhizomes of Actaea racemosa.* J Nat Prod, 2010. **73**(12): p. 2024-8.

J. Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfgang Blaschek für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seiner Bereitschaft zur Betreuung der Arbeit. Seine Anregungen und ständige Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau PD Dr. Gudrun Abel möchte ich herzlichst danken für die Bereitschaft als 2. Gutachter diese Arbeit zu bewerten. Die immer freundliche und hilfsbereite Unterstützung, Ihr Engagement und Ihre organisatorischen Fähigkeiten haben viele Kooperationen ermöglicht, die das Vorankommen dieser Arbeit maßgeblich beeinflusst haben.

Bei der Firma Bionorica möchte ich mich sehr für die finanzielle Unterstützung bedanken und für die Bereitschaft einen Doktoranden zu fördern.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Stuppner möchte ich mich herzlich für die Betreuung seitens der Pharmakognosie der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck bedanken. Hier gilt auch mein Dank Frau Dr. Sonja Sturm, Dr Serhat Cicek und Dr. Valerio Pieri.

Bei Frau Dr. Jutta Haunschild und Dr. Meinolf Wonnemann möchte ich mich für die Unterstützung und fachliche Betreuung des pharmakologischen Teils bedanken.

Den Kolleginnen und Kollegen des BN_02 Osteoporose Projektes gilt mein besonderer Dank für ein spannendes und interessantes Thema ohne das diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Dr. Günter Stecher möchte ich überaus danken für die kompetente, fachliche Unterstützung und Betreuung der Arbeit sowie für seine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft.

Dr. Daniel Intelmann danke ich für die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen in allen Belangen. Aber auch für die vielen lustigen Abende in Innsbruck und die Abfahrten von Höttinger- und Arzler Alm mit Bekanntschaften des Brombeerstrauches.

DANKSAGUNG

Hier gilt auch ein besonderer Dank Dr. Moritz Rubner für die tatkräftige Unterstützung und ohne Ihn wäre diese Arbeit vielleicht, aufgrund eines wütenden Tiroler Bauern, nicht zustande gekommen. Moritz: Irgendwann schaffen wir die Runde noch.

Der gesamten Bionorica Research GmbH möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen. Dafür, dass Sie mich jederzeit wohl aufgenommen, unterstützt und mir immer wieder die Geräte überlassen haben. Besonderer Dank gilt hier Alban Karlseder der mich sehr gut in die Thematik *A. racemosa* eingearbeitet hat, aber auch allen anderen: Michael, Wolfgang, Sigrid, Christina, Karin, Astrid, Christian, Daniel F. und Martina möchte ich mich für den stets freundlichen und hilfsbereiten Umgang bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei dem gesamten Bionorica Team. Besonders Andreas, Bettina und Bernhard für die ständige Unterstützung was den Konsum von Kaffee und Rotweinkuchen angeht, aber auch in jeglichen HPLC- und sonstigen fachlichen Fragen. Vor allem Bernhard danke ich für den besten Bürokollegen den man sich wünschen kann und für die beste Stresstherapie nach Macherey – Nagel.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Schwiegereltern, meiner Schwester und Schwägerin, die mich ermutigt haben, diese Arbeit durchzuführen und währenddessen stets für ausreichend familiären Rückhalt, Motivation und neuen Ansporn sorgten. Auch für die großzügige Unterstützung während der Promotion möchte ich euch ganz herzlich danken. Lieber Papa vielen Dank für das Korrekturlesen der Arbeit.

Das GRÖSSTE Dankeschön geht an meine Frau Kati, die mit Sicherheit von allen am meisten unter mir zu leiden hatte in den letzten Monaten und doch erstaunt war, von meiner Fähigkeit meine Gedanken in Worte zu fassen.

Last but not least: dem kleinen Sonnenschein Valentine, die mir die Motivation gegeben hat, diese Arbeit schnellstens fertigzustellen.

K. Publikationen

Posterbeitrag:

Kammann, M., Karlseder A., Intelmann D., Seidlová-Wuttke D., Wuttke W., Stecher G., Abel G., Stuppner H., Popp M., *Black Cohosh and the protective effect on bone metabolism as measured by computed tomography in ovariectomized rats*, GA Congress, Antalya 2011, 2011

Publikationen:

Seidlova-Wuttke D., Eder N., Stahnke V., Kammann M., Stecher G., Haunschild J., Wessels J. T., Wuttke W., *Cimicifuga racemosa and its triterpene-saponins prevent the Metabolic Syndrome and deterioration of cartilage in the knee joint of ovariectomized rats by similar mechanisms*, Phytomedicine, 2012. 19(8-9): p. 846-53.

Seidlova-Wuttke D., Stecher G, Kammann M., Haunschild J., Eder N., Stahnke V., Wessels J., Wuttke W., *Osteoprotective effects of Cimicifuga racemosa and its triterpene-saponins are responsible for reduction of bone marrow fat*, Phytomedicine, 2012. 19(10): p. 855-60

Wuttke W., Jarry H., Haunschild J., Stecher G., Schuh M., Seidlova-Wuttke D., *The non-estrogenic alternative for the treatment of climacteric complaints: Black cohosh (Cimicifuga or Actaea racemosa)*, J Steroid Biochem Mol Biol, 2013.

Andrea Düregger, Fabian Guggenberger, Jan Barthelmes, Markus Schuh, Günther Stecher, Daniel Intelmann, Gudrun Abel, Jutta Haunschild, Helmut Klocker, Reinhold Ramoner, Natalie Sampson, *Attenuation of nucleoside and anti-cancer nucleoside analog drug uptake in prostate cancer cells by Cimicifuga racemosa extract BNO-1055*. Phytomedicine 2013

In Review:

Schuh, M., Intelmann D., Abel G., Blaschek W., *Detailed chemical characterisation of the special extract BNO 1055 from Actaea racemosa L.*, Planta Medica 2013

PUBLIKATIONEN

Patent:

European Patent Application EP2545932: Intelmann, D.G.-E.-S., 6020 Innsbruck, AT), Schuh, Markus (Rilkestrasse 15, 90419 Nürnberg, DE), Stecher, Guenther (Oberer Feldweg 30, 6091 Götzens, AT), Abel, Gudrun (Veilchenweg 5, 91301 Forchheim, DE), Jakob, Franz (Adalbert-Stifter-Weg 6, 97082 Würzburg, DE), Ebert, Regina (Dürerweg 1, 97241 Bergtheim, DE), Wuttke, Wolfgang (Domäne 8, 37120 Bovenden, DE), Seidlovà-wuttke, Dana (Domäne 8, 37120 Bovenden, DE),, Selected *Cimicifuga* fractions for treating osteoporosis. 2013, Bionorica, SE (Kerschensteinerstrasse 11 -15, 92318 Neumarkt, DE).

L. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Markus Schuh geb. Kammann

Geburtsdatum: 20.06.1983 in Nördlingen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildung:

| | |
|-------------------|--|
| 12/2008 | Erteilung der Approbation als Apotheker |
| 11/2008 | Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung |
| 10/2007 | Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung |
| 09/2005 | Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung |
| 10/2003 – 10/2007 | Studium der Pharmazie an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg |
| 1993 – 2002 | Albrecht-Ernst-Gymnasium Oettingen (Abschluss: Allgemeine Hochschulreife) |

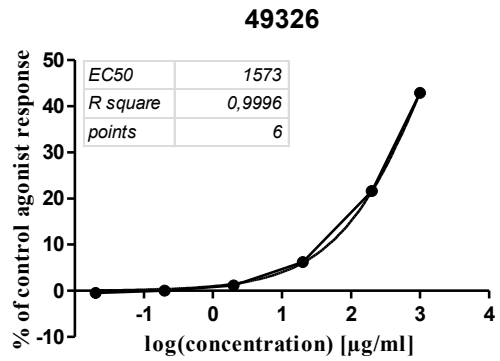
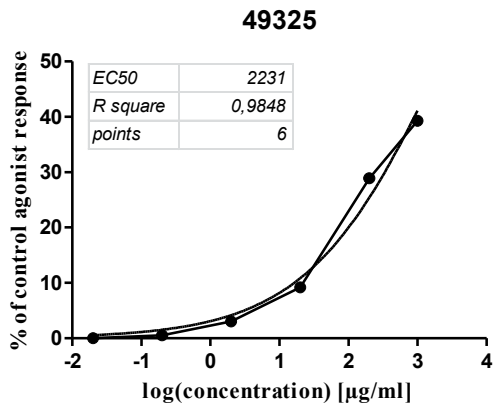
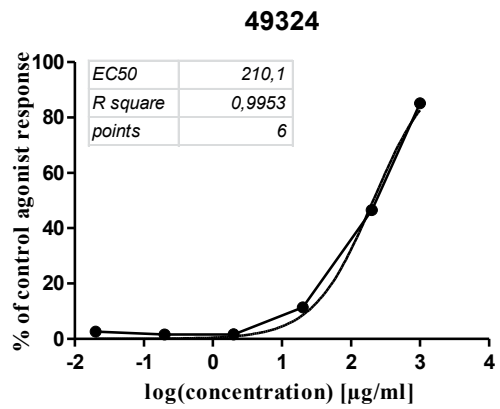
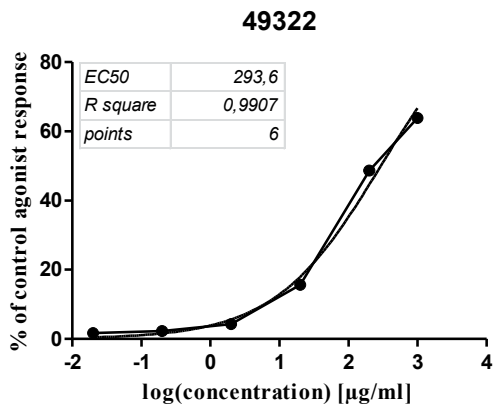
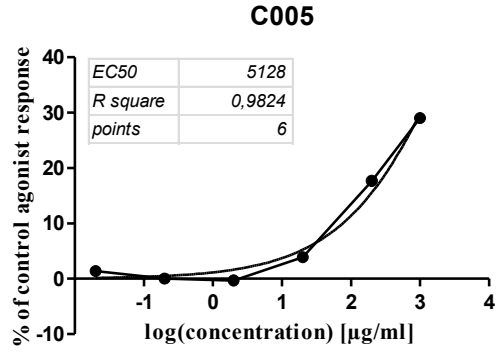
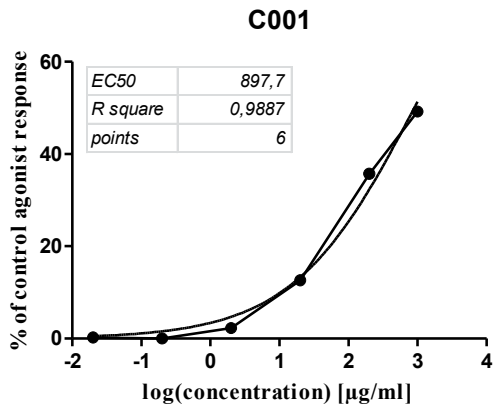
Zivildienst

09/2002 – 06/2003 Chirurgische Station 3b des Stiftungskrankenhauses Nördlingen

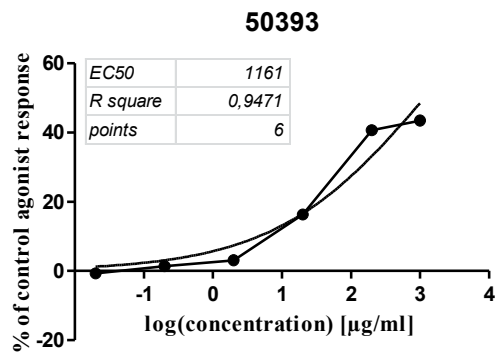
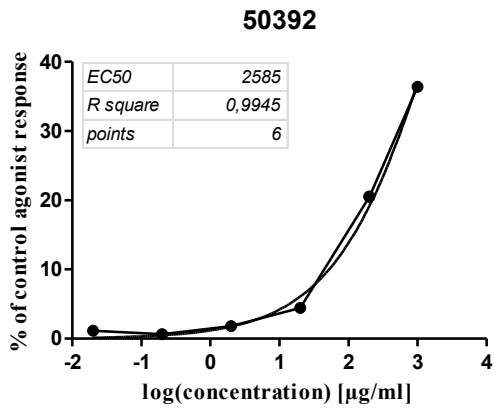
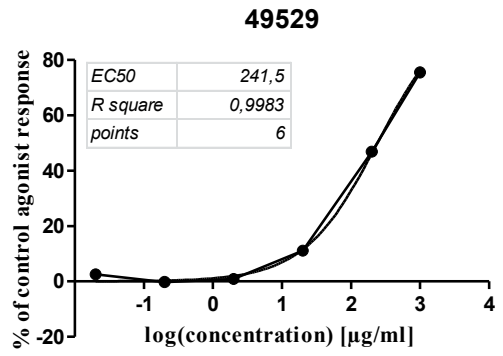
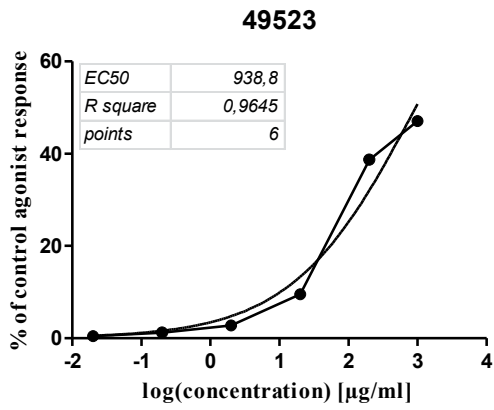
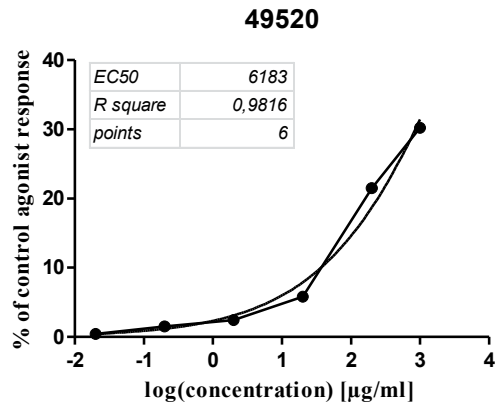
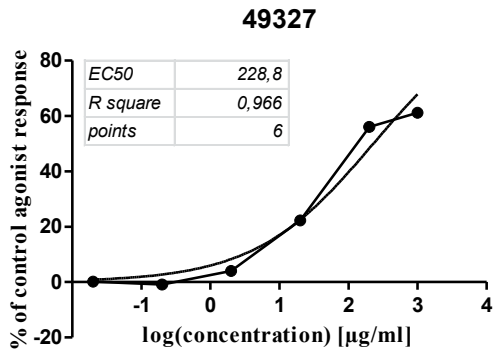
Berufliche Tätigkeiten:

| | |
|-------------------|--|
| Seit 08/2013 | GMP-Compliance Manager, Qualitätskontrolle Pharma, Bionorica SE, Kerschensteinerstrasse. 11 – 15, 92318 Neumarkt |
| 11/2012 – 07/2013 | stellv. Laborleitung Qualitätskontrolle Pharma, Bionorica SE, Kerschensteinerstrasse. 11 – 15, 92318 Neumarkt |
| 06/2010 – 10/2012 | Doktorand, Bionorica SE, Kerschensteinerstrasse. 11 – 15, 92318 Neumarkt, unter Betreuung von Prof. Dr. Wolfgang Blaschek, Institut für Pharmazeutische Biologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Gutenbergstr. 76, 24118 Kiel |
| 09/2009 – 05/2010 | Apotheker in Vollzeit in der Fleming-Apotheke, Gibitzenhofstr. 37, 90443 Nürnberg |
| 01/2009 – 08/2009 | Apotheker in Vollzeit in der Wallenstein-Apotheke, Lange Str. 3, 96047 Bamberg |
| 05/2008 – 10/2008 | Pharmaziepraktikum in der Apotheke des Universitätsklinikum Erlangen, Palmsanlage 6, 91054 Erlangen |
| 11/2007 – 04/2008 | Pharmaziepraktikum in der Markt-Apotheke Pharma24 OHG, Klosterhof 6, 91077 Neunkirchen am Brand |

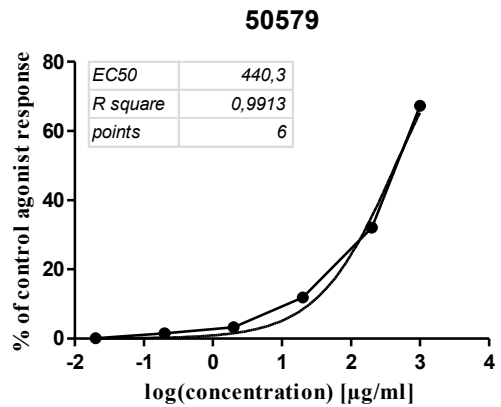
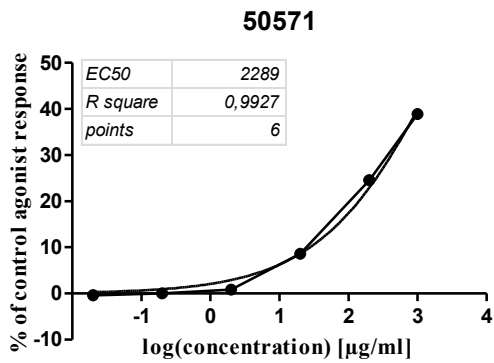
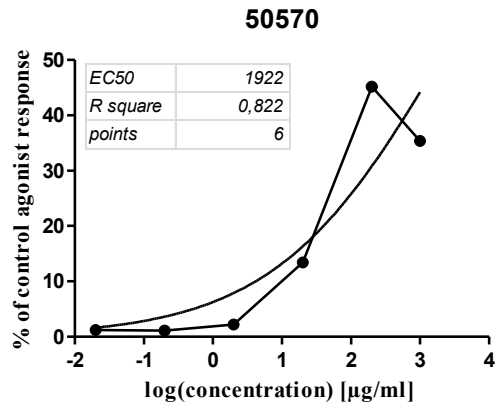
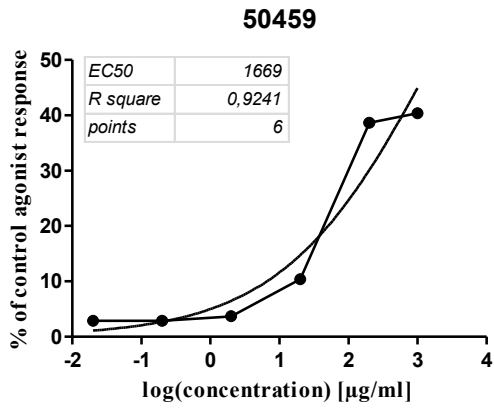
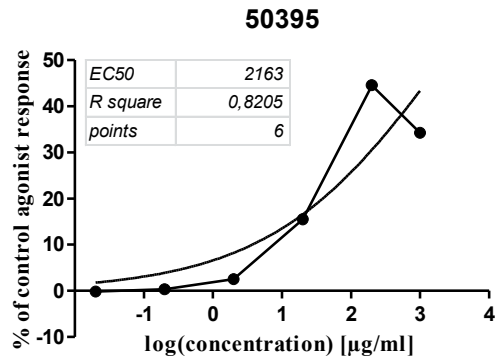
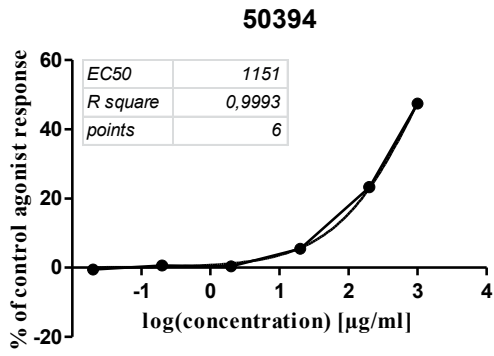
M. Anhang



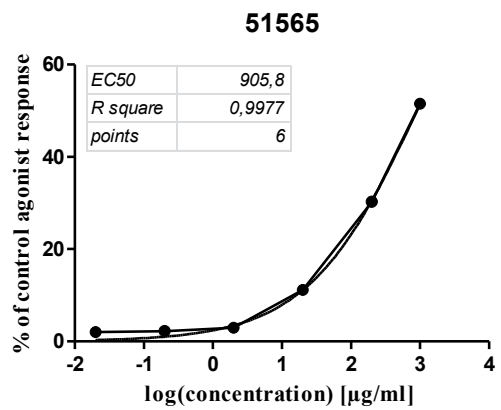
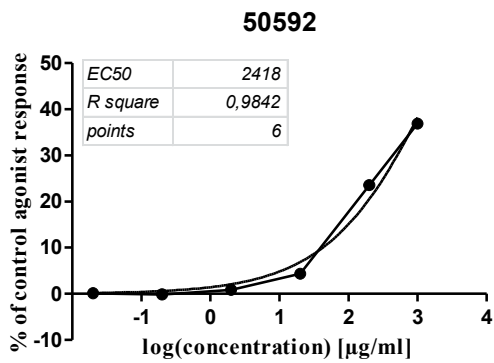
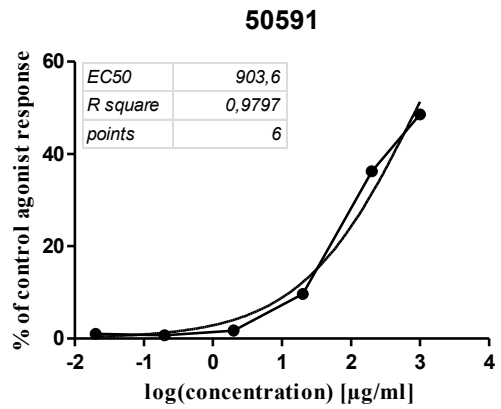
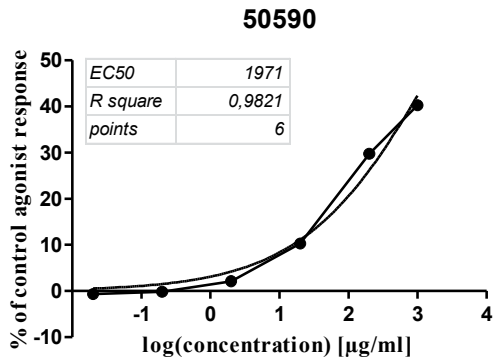
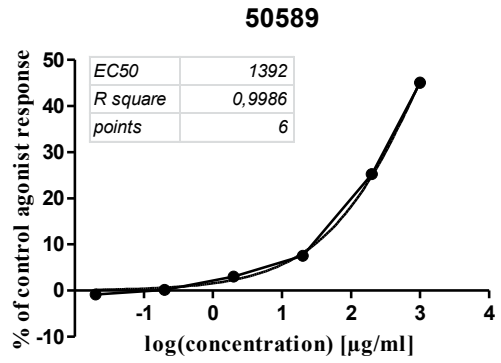
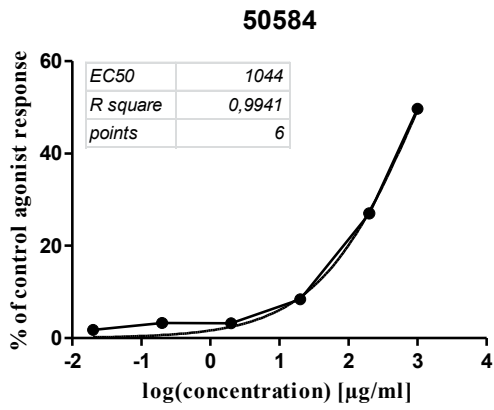
ANHANG



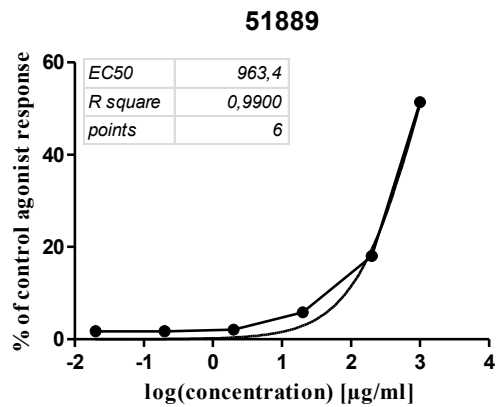
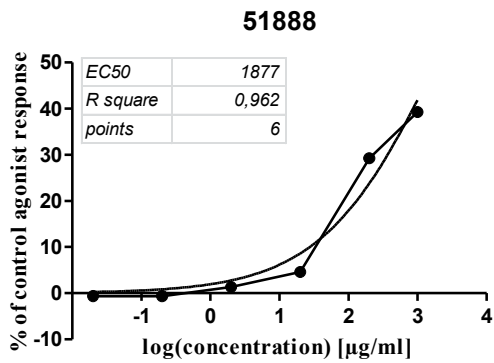
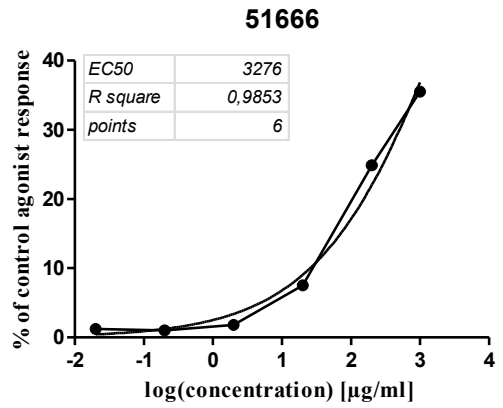
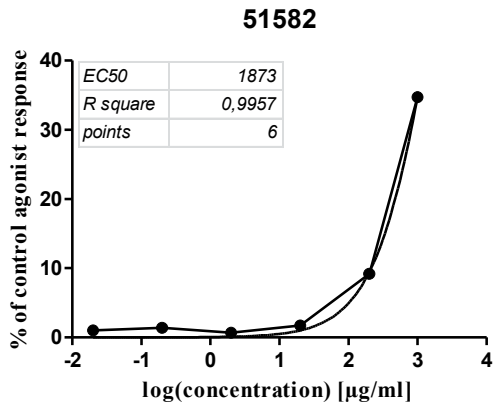
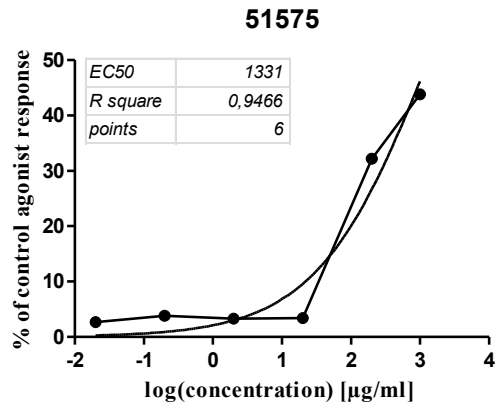
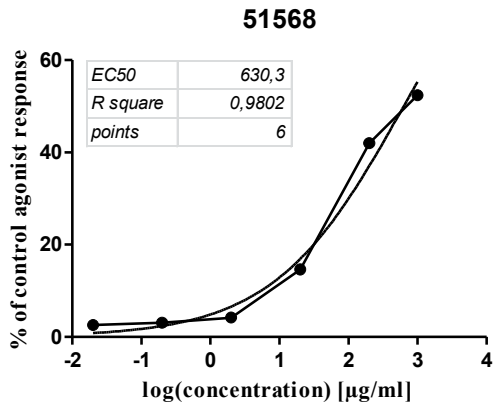
ANHANG



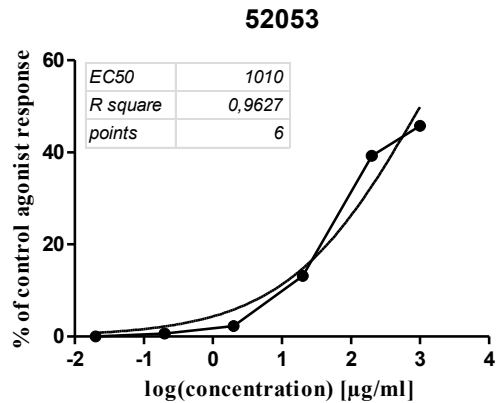
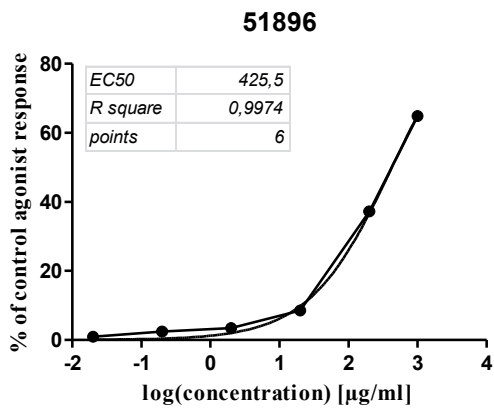
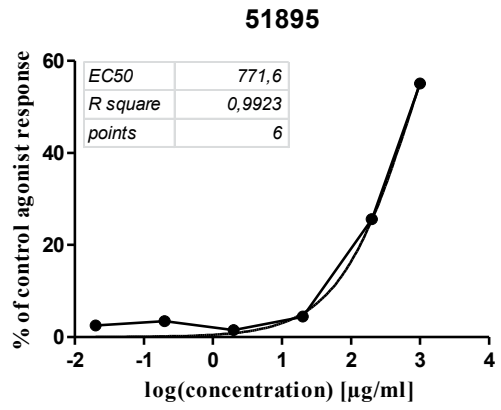
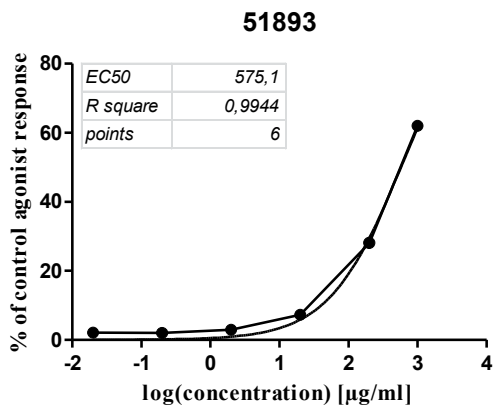
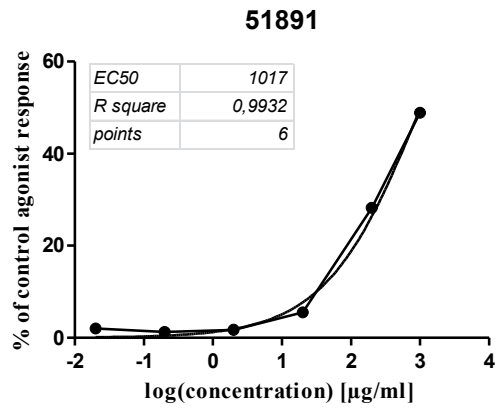
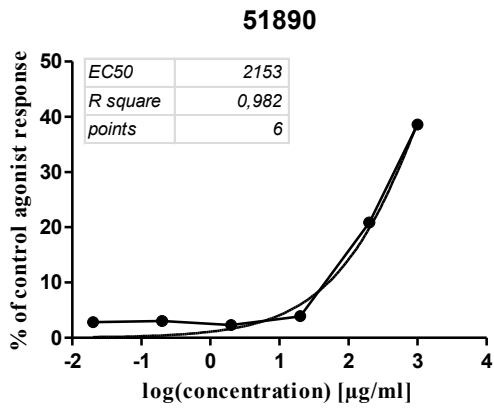
ANHANG



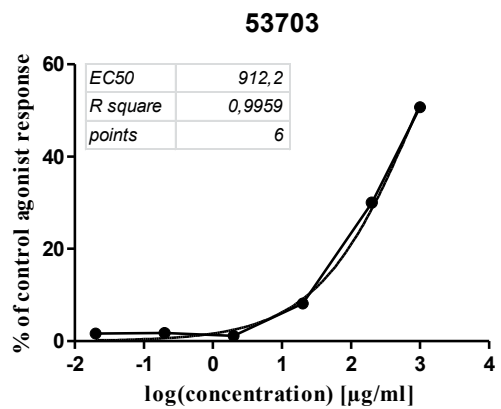
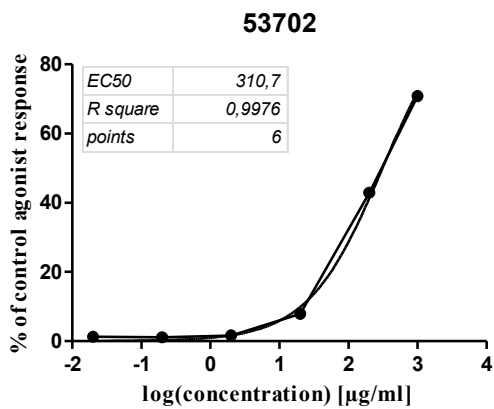
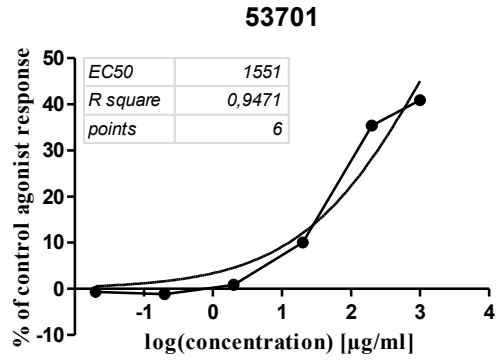
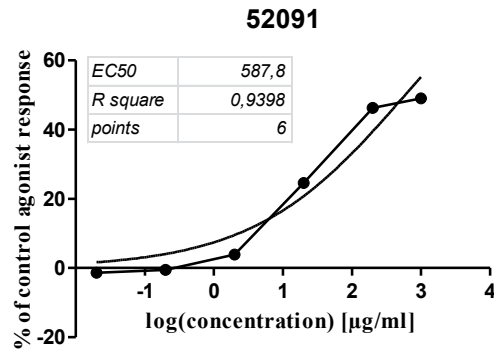
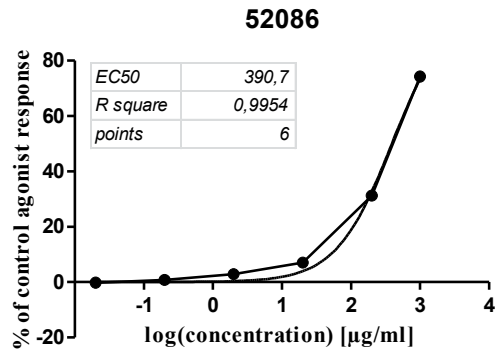
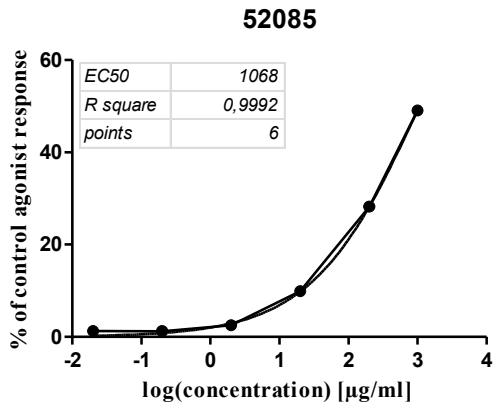
ANHANG



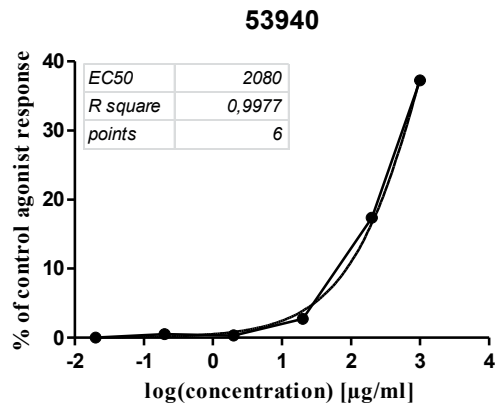
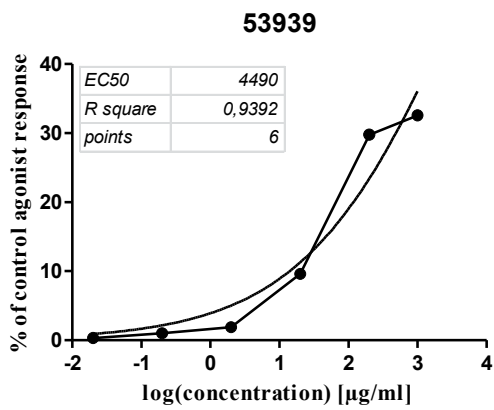
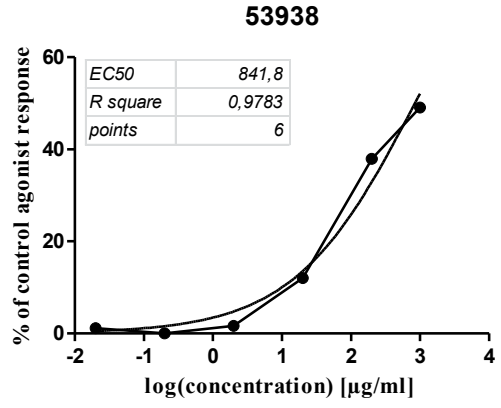
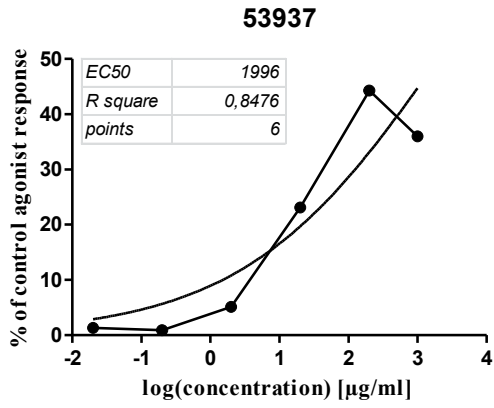
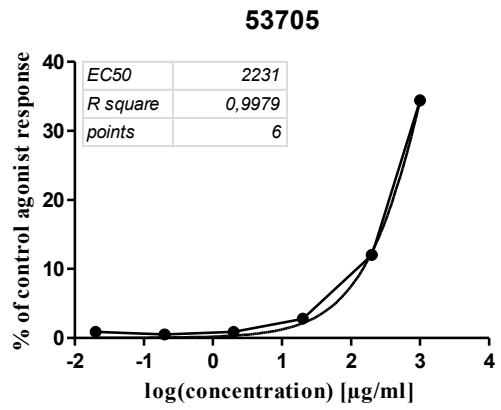
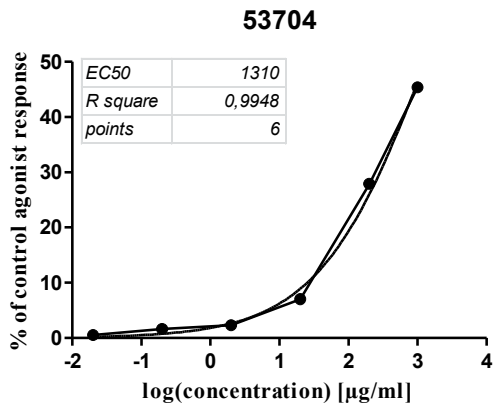
ANHANG



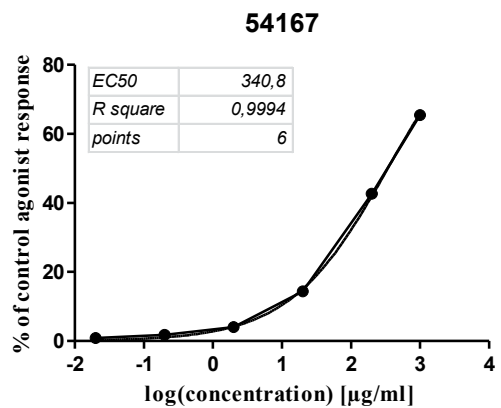
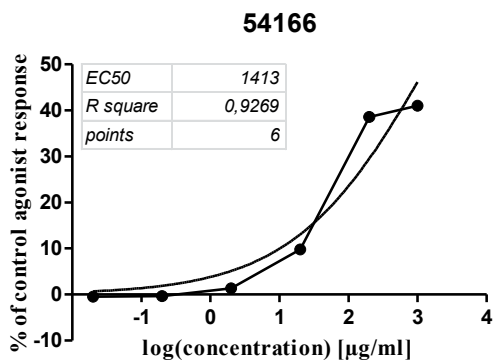
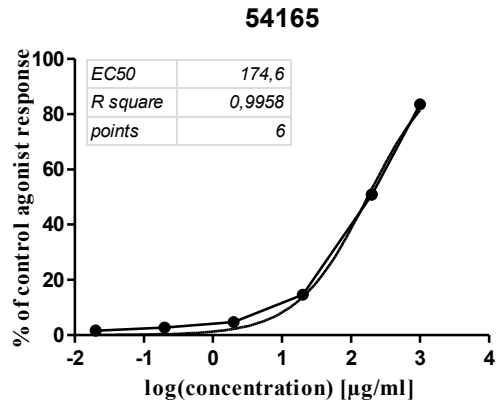
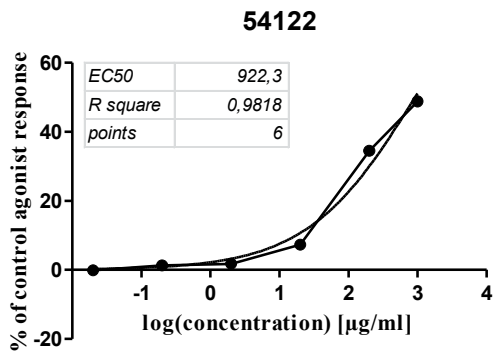
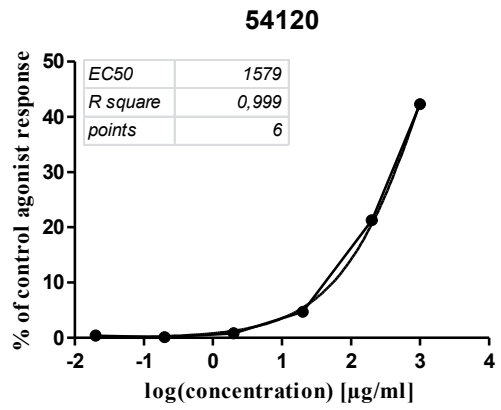
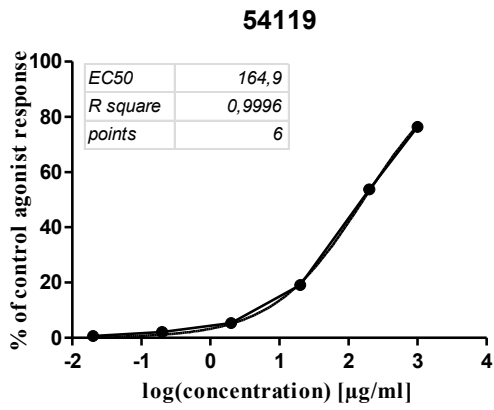
ANHANG



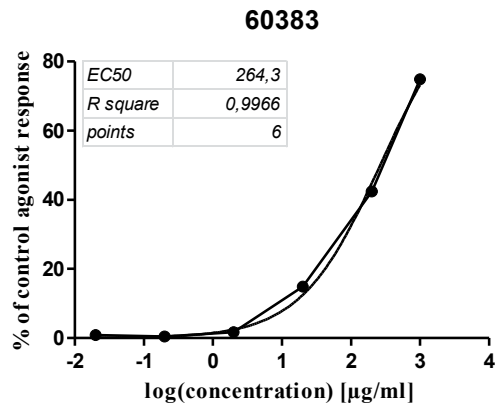
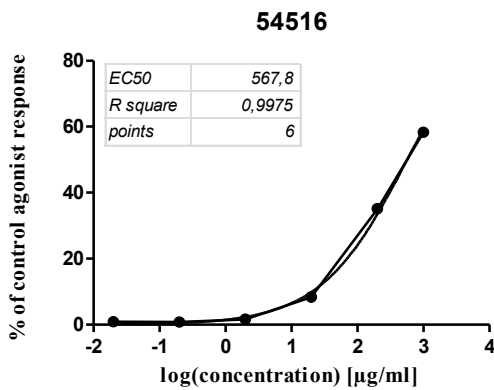
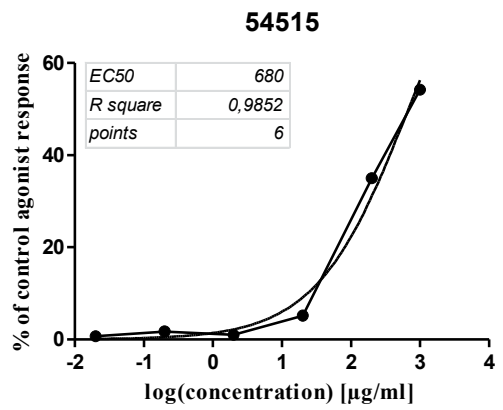
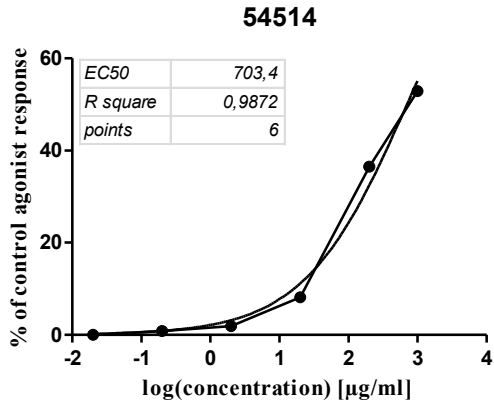
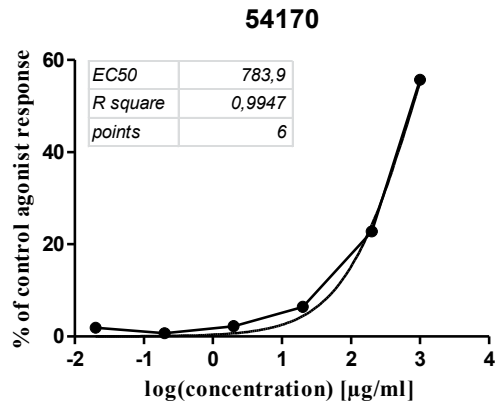
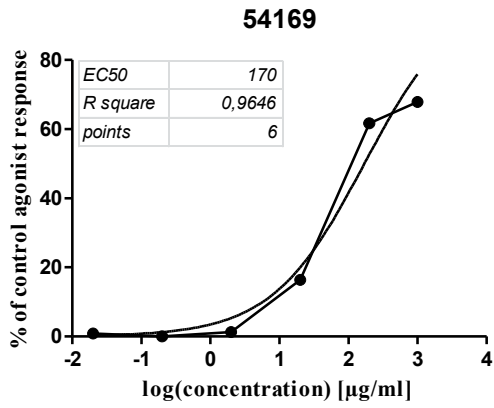
ANHANG



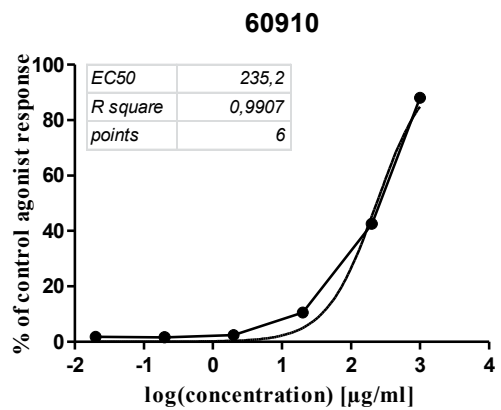
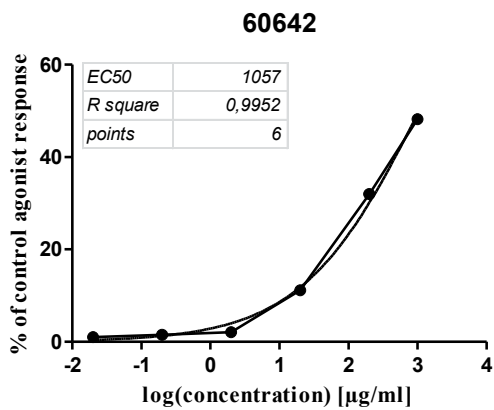
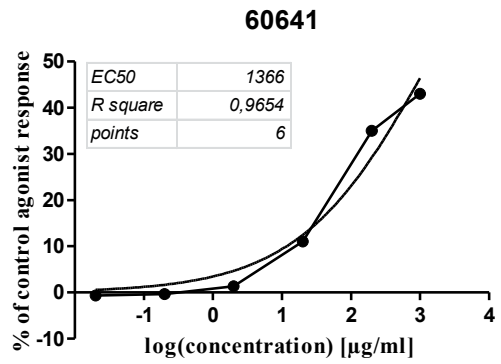
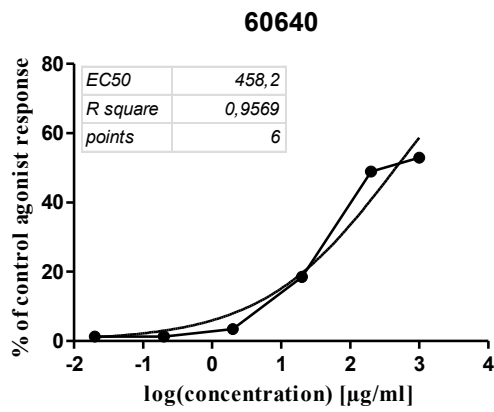
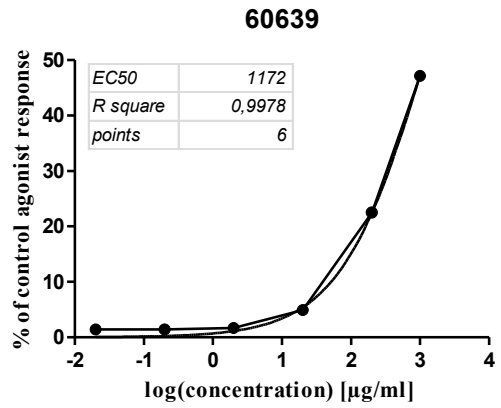
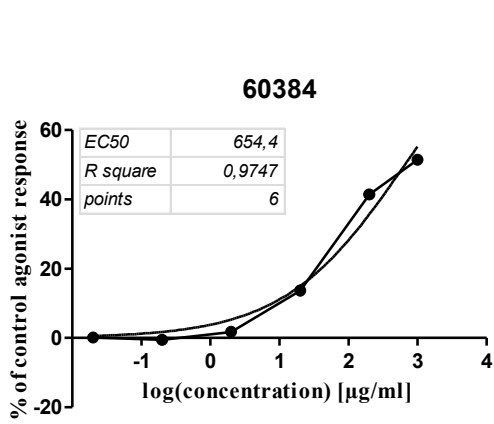
ANHANG



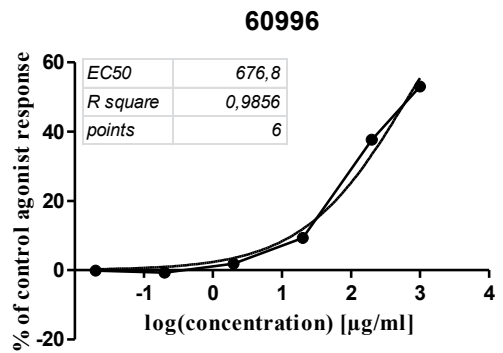
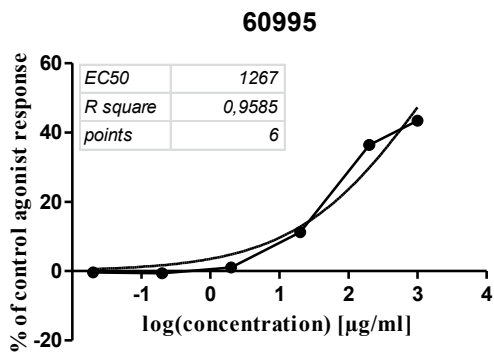
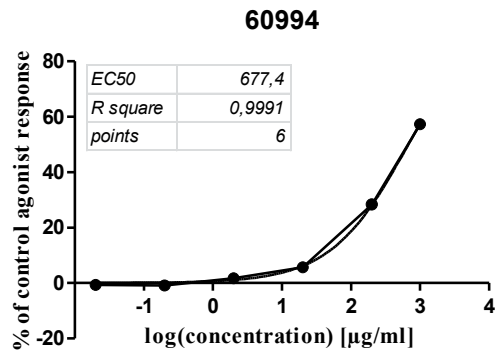
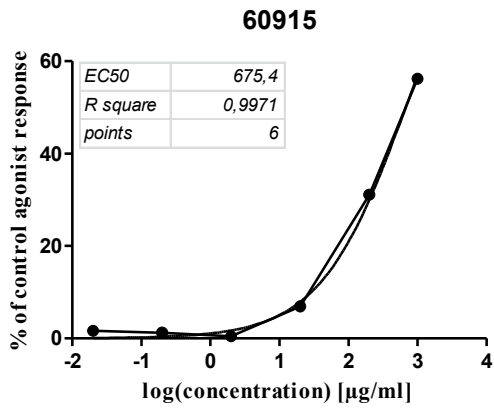
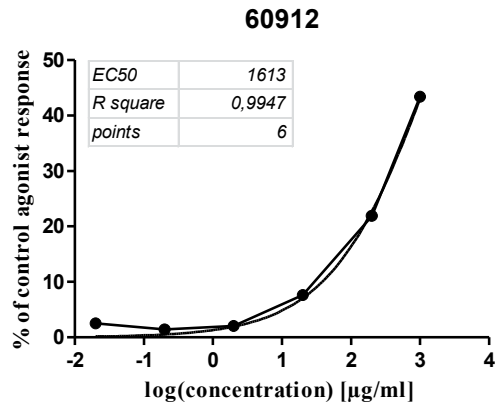
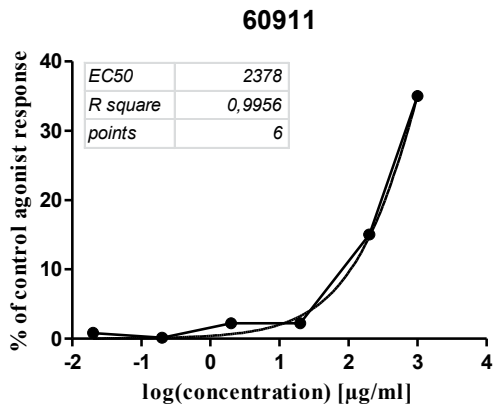
ANHANG



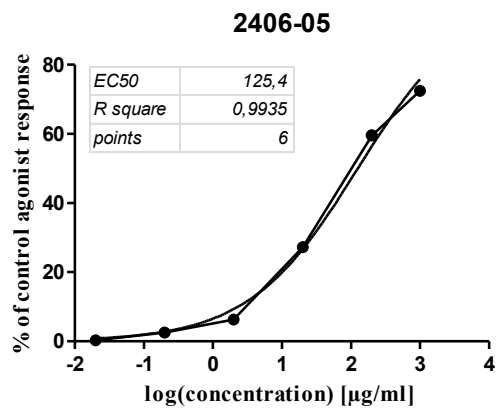
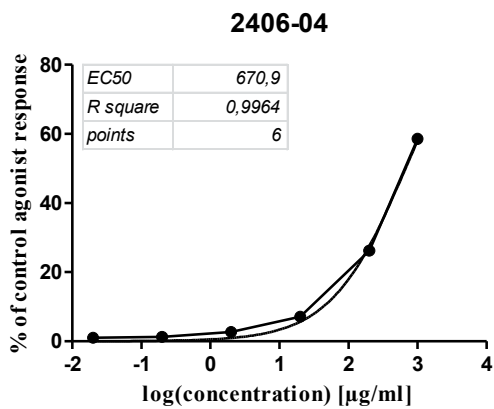
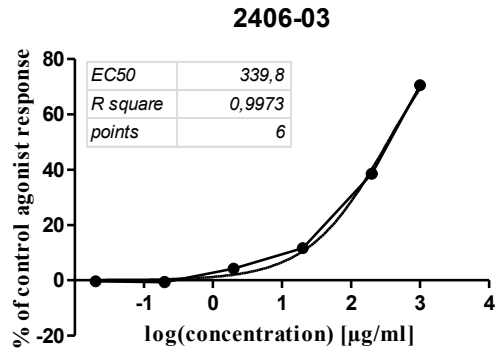
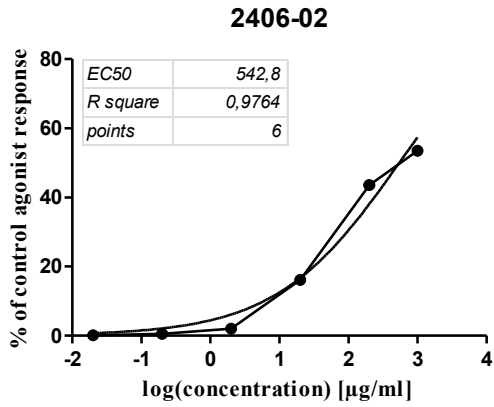
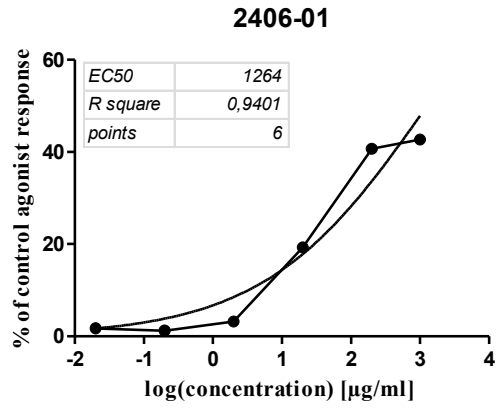
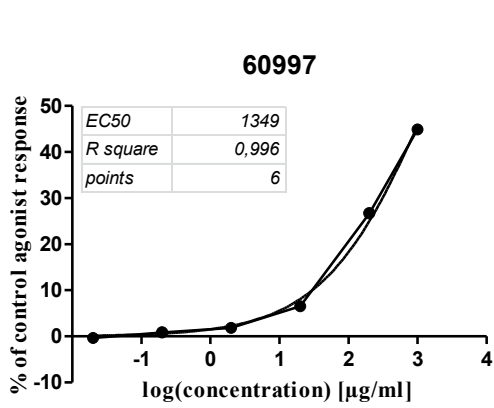
ANHANG



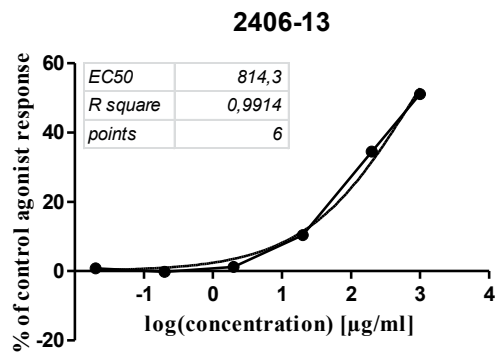
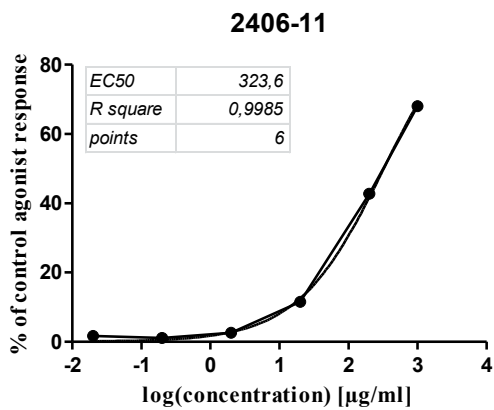
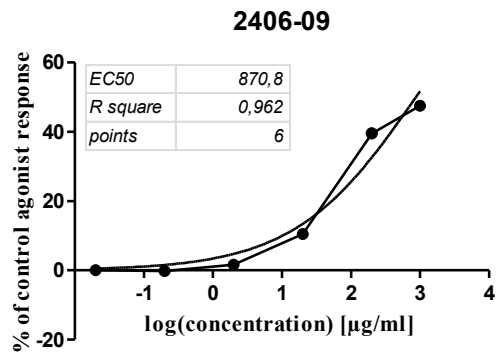
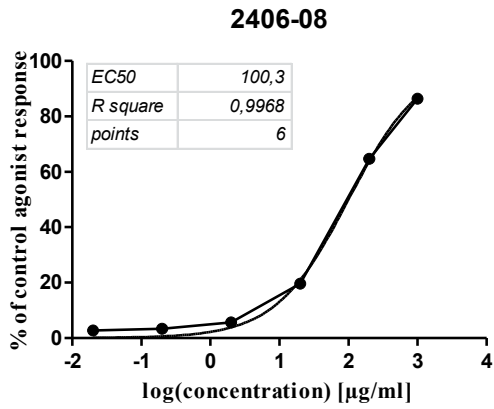
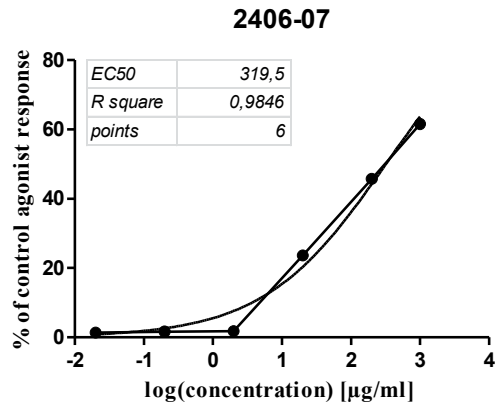
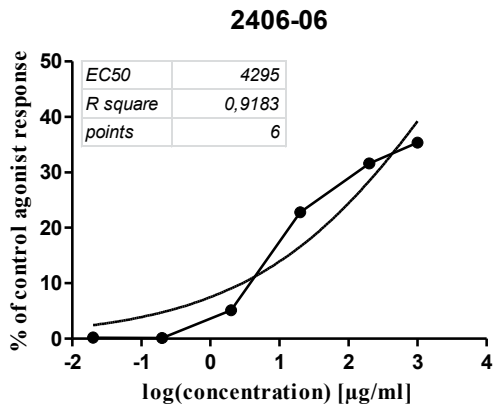
ANHANG



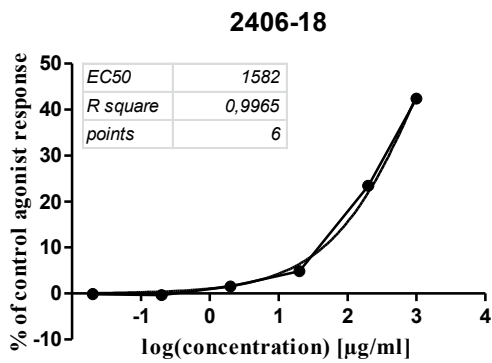
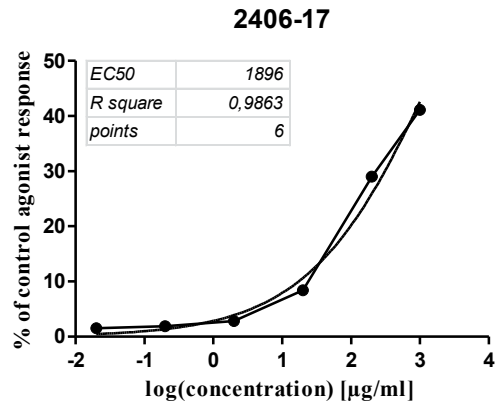
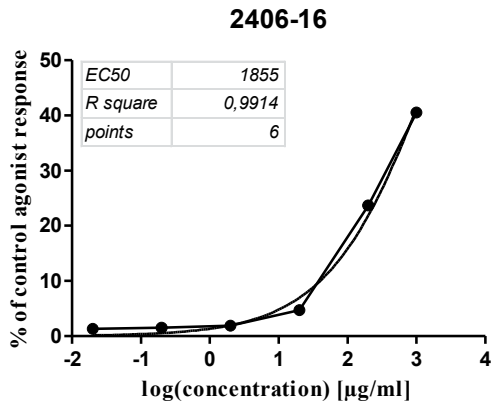
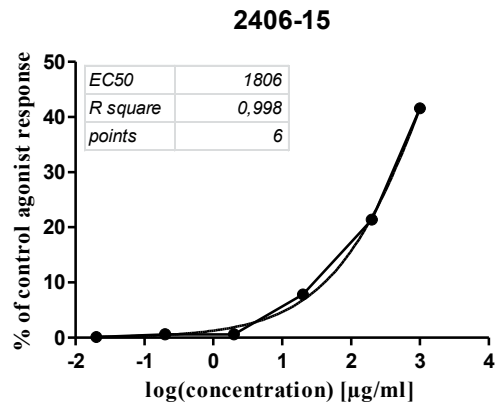
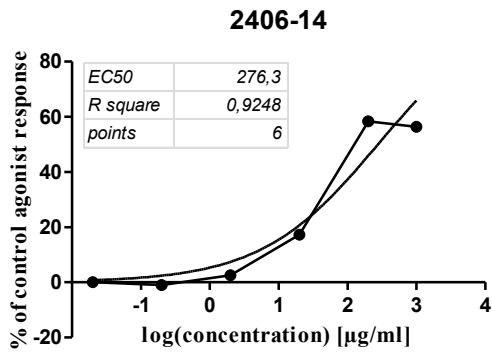
ANHANG



ANHANG



ANHANG



N. Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung zu §8 Absatz 1 der Promotionsordnung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich Pharmazie eingereichte Arbeit zum Zwecke der Promotion am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abteilung Pharmazeutische Biologie, unter der Leitung von Professor Dr. Wolfgang Blaschek selbst durchgeführt oder auf Hilfe von anderer Seite verwiesen habe, bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe und die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit bisher weder der Math.-Nat. Fakultät der CAU noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zweck der Promotion eingereicht habe.

Nürnberg, den 25.10.2013

Markus Schuh

