

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen
der Arzneipflanzen**

***Phyllanthus amarus* SCHUMACH. & THONN.,
Mucuna pruriens L.
und
Cissus quadrangularis L.**

von

Per Nerdinger

aus

Augsburg

2001

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne des § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. H. Wagner betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 27.6.2001

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'P. Nerdinger', written in a cursive style.

(Unterschrift des Autors)

Dissertation eingereicht am: 27.6.2001

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Wagner

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Vollmar

Tag der mündlichen Prüfung: 27.7.2001

„Alle monner drar, sa musen og tisset i havet.“

(norwegisches Sprichwort)

Abkürzungsverzeichnis

A	Säure (acid)
AF ⁴	asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung (AF ⁴)
ara	Arabinose
AZT	Azidothymidin
D	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl-
demin.	demineralisiert
DHE	Dihydroethidium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Elementaranalyse
EC ₅₀	Konzentration bei halbmaximaler Wirkung
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
<i>f</i>	Furanose
FAB	fast-atom bombardment
FFF	Feldflußfraktionierung
FFFF	Fluß-Feldflußfraktionierung
FID	Flammenionisationsdetektor
FKS	fötales Kälberserum
fru	Fructose
gal	Galaktose
galA	Galakturonsäure
GC	Gaschromatographie
glu	Glucose
gluA	Glucuronsäure
GPC	Gelpermeationschromatographie
HBsAg	hepatitis B surface antigen
HBV	hepatitis B virus
HIV	human immunodeficiency virus
HPGPC	high performance gel permeation chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	Konzentration des Inhibitors bei 50%-Hemmung des Enzyms
i.p.	intraperitoneal

i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
KS	Kompartiment-System
LASER	light amplification by stimulated emission of radiation
LD	letale Dosis
L-DOPA	L- β -(3,4-Dihydroxy-phenyl)-alanin
M	Molekulargewicht
MAGI	multinukleare Aktivierung der Galaktosidase-Induktion
mal	Maltose
MALDI-TOF	matrix assisted LASER desorption/ionisation – time of flight
man	Mannose
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
NMR	nuclear magnetic resonance
ρ	Pyranose
PMAA	permethylierte Alditolacetate
PMN	polymorphkernige Neutrophile
ppm	parts per million
PBS	phosphate buffered saline
PS	Polysaccharid
R_f	Retentionsfaktor (retension factor)
rha	Rhamnose
RI	Brechungsindex
rib	Ribose
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
R_t	Retentionszeit (retension time)
RT	reverse Transkriptase
SLS	statische Lichtstreuung
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Uro	Uronsäure (Zuckersäure)
vis	(Färbung) im sichtbaren
xyl	Xylose

Inhaltsverzeichnis

A	EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG.....	1
B	PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN VON <i>PHYLLANTHUS AMARUS</i> SCHUMACH. & THONN.	3
1.	Allgemeine Übersicht.....	3
1.1.	Systematik und Verbreitung	3
1.2.	Botanische Beschreibung	5
1.3.	Bekannte Inhaltsstoffe	6
1.3.1.	Niedermolekulare Inhaltsstoffe	6
1.3.2.	Hochmolekulare Inhaltsstoffe	10
1.4.	Volksmedizinische Verwendung	11
1.5.	Pharmakologie.....	11
2.	Eigene Untersuchungen der Polysaccharide	13
2.1.	Isolierung und Fraktionierung des Rohpolysaccharidgemisches	13
2.2.	Charakterisierung der Rohpolysaccharide	15
2.2.1.	Zuckeranalyse	15
2.2.2.	Uronsäureanalyse	16
2.2.3.	Proteingehalt	17
2.2.4.	High Performance Gel Permeation Chromatography (HPGPC)	17
2.3.	Isolierung und Charakterisierung der Hauptpolysaccharide aus den Rohpolysaccharid 1+1- und 1+4-Fällungen.....	19
2.3.1.	Isolierung	19
2.3.2.	Charakterisierung	24
2.4.	Strukturaufklärung des Hauptpolysaccharids B	26
2.4.1.	Molekülgrößenbestimmung	26
2.4.2.	Neutralzuckeranalyse.....	26
2.4.3.	Bestimmung des Veresterungsgrades	28
2.4.4.	Bestimmung des Restwassergehalts.....	28

2.4.5.	Methylierungsanalysen.....	29
2.4.6.	Methylierungsanalyse des Partialhydrolysats.....	33
2.4.7.	Reduktion des Polysaccharids B mit Natriumbordeuterid	36
2.4.8.	¹³ C-Kernresonanzspektroskopie.....	39
2.4.9.	Zusammenfassung der Ergebnisse des Polysaccharids B	43
3.	Sulfatierung des Phyllanthus-Polysaccharids B	48
4.	Isolierung verschiedener Gallotannine	50
4.1.	Charakterisierung	50
4.2.	Isolierung	52
4.3.	Identifizierung	53
4.4.	Pharmakologie.....	56

C PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN VON *MUCUNA PRURIENS* L..... 58

1.	Allgemeine Übersicht.....	58
1.1.	Systematik und Verbreitung	58
1.2.	Botanische Beschreibung	59
1.3.	Bekannte Inhaltsstoffe	60
1.3.1.	Niedermolekulare Inhaltsstoffe	61
1.3.2.	Hochmolekulare Inhaltsstoffe	61
1.4.	Volksmedizinische Verwendung	62
1.5.	Pharmakologie.....	63
2.	Eigene Untersuchungen der Polysaccharide.....	65
2.1.	Isolierung und Fraktionierung der Rohpolysaccharide.....	65
2.2.	Allgemeine Charakterisierung der Rohpolysaccharide	67
2.2.1.	Zuckeranalyse.....	67
2.2.2.	Uronsäureanalyse	68
2.2.3.	Proteingehalt	68
2.2.4.	High Performance Gel Permeation Chromatography (HPGPC).....	68
2.3.	Isolierung und Charakterisierung des Hauptpolysaccharids.....	70
2.3.1.	Isolierung	70
2.3.2.	Charakterisierung	70

D	PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN VON	
	<i>CISSUS QUADRANGULARIS</i> L.....	83
1.	Allgemeine Übersicht.....	83
1.1.	Systematik und Verbreitung	83
1.2.	Botanische Beschreibung	84
1.3.	Bekannte Inhaltsstoffe	85
1.3.1.	Niedermolekulare Inhaltsstoffe	85
1.3.2.	Hochmolekulare Inhaltsstoffe	86
1.4.	Volksmedizinische Verwendung	86
1.5.	Pharmakologie.....	86
2.	Eigene Untersuchungen der Polysaccharide	87
2.1.	Isolierung und Fraktionierung des Rohpolysaccharidgemisches	87
2.2.	Allgemeine Charakterisierung der Rohpolysaccharid-Fällungen.....	88
2.2.1.	Zuckeranalyse	88
2.2.2.	Uronsäureanalyse	89
2.2.3.	Proteingehalt	89
2.2.4.	High Performance Gel Permeation Chromatography (HPGPC)	89
2.3.	Isolierung und Charakterisierung von Polysaccharid B	90
2.3.1.	Isolierung	90
2.3.2.	Charakterisierung	91
E	ASYMMETRISCHE FLUß-FELDFLUßFRAKTIONIERUNG (AF⁴)...103	
1.	Trennprinzip	103
2.	Versuchsaufbau	104
3.	Molekulargewichtsbestimmung von Polysacchariden mittels AF ⁴ - und RI-Detektor	105
4.	Molekulargewichtsbestimmung von Polysacchariden mittels AF ⁴ , RI- und Lichtstredetektor	109

F PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN 113

1.	Prüfung von Polysacchariden auf Zytotoxizität	113
2.	Aktivierung der unspezifischen Immunabwehr durch Polysaccharide	113
2.1.	Phagozytoseinduktion durch Polysaccharide	115
2.2.	Steigerung der "oxidative burst"-Aktivität durch Polysaccharide	119
2.3.	Zusammenfassung	123
3.	Untersuchungen von Polysacchariden auf antivirale Aktivität	124
3.1.	Wirkung von Polysacchariden auf das Hepatitis B Virus	125
3.2.	Wirkung von Polysacchariden auf die „Human Immundeficiency Virus“ (HIV) -Replikation	126
4.	Untersuchungen von Polysacchariden auf antiphlogistische Wirkung	130
4.1.	Polysaccharide mit antiphlogistischer Wirksamkeit	131
4.2.	Rattenpfotenödemtest der Phyllanthus-, Mucuna- und Cissus- Polysaccharide	133

G ZUSAMMENFASSUNG 142

1.	Phytochemie	142
2.	Molekulargewichtsbestimmung	144
3.	Pharmakologie	145
3.1.	Immunmodulatorische Aktivität	145
3.2.	Antivirale Aktivität	146
3.3.	Antiphlogistische Aktivität	147

H MATERIAL UND METHODEN..... 149

1.	Drogen-/ Polysaccharidherkunft.....	149
2.	Physikalisch-Chemische Arbeitsmethoden.....	149
2.1.	Analytische Dünnschichtchromatographie	149
2.2.	HPLC.....	150
2.3.	Trennung an Sephadex LH 20	151
2.4.	Dialyse.....	151

2.5.	Zentrifugation.....	151
2.6.	Lyophilisation	152
2.7.	Elementaranalyse	152
2.8.	¹ H- und ¹³ C- Kernresonanzspektroskopie	152
2.9.	Bestimmung der optischen Drehung	152
2.10.	Bestimmung des Wassergehalts	153
2.11.	Molekulargewichtsbestimmung	154
2.11.1.	High Performance Gel Permeation Chromatography (HPGPC)	154
2.11.2.	Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung (AF ⁴)	155
2.12.	Proteingehalt nach LOWRY [1951].....	156
2.13.	Uronsäurebestimmung nach BLUMENKRANTZ [1973].....	157
2.14.	Dünnschichtchromatographie (Monosaccharide bzw. Polysaccharide nach Hydrolyse).....	157
2.15.	Neutralzuckeranalyse der Alditolacetate	158
2.15.1.	Darstellung der Alditolacetate nach BLAKENEY [1983].....	158
2.15.2.	Gaschromatographie – Trennung der Alditolacetate (quantitative Neutralzuckeranalyse).....	159
2.16.	Methylierungsanalyse der Polysaccharide nach HARRIS [1984]	159
2.17.	Gaschromatographische Trennung der Alditolacetate und massenspektrometrische Untersuchung der Fraktionen (GC-MS).....	162
2.18.	Bestimmung des Acetylierungsgrades nach McCOMB [1957].....	162
2.19.	Bestimmung von Uronsäureestern nach SCHÖLLHORN [1994].....	163
2.20.	Reduktion der Uronsäuren nach TAYLOR [1972]	164
2.21.	Synthese von Inosithexaacetat.....	165
3.	Phytochemische Arbeitsmethoden.....	165
3.1.	Gewinnung der Polysaccharidrohgemische aus dem Heißwasserextrakt	165
3.2.	TCA-Proteinfällung aus dem Polysaccharidrohgemisch	166
3.3.	Anionenaustauschchromatographie	166
3.4.	Gelpermeationschromatographie	167
3.4.1.	Weitere Aufreinigung	167
3.4.2.	Entsalzung	167
3.5.	Hydrolysen	168

3.5.1.	Totalhydrolyse	168
3.5.2.	Partialhydrolyse nach BUCHALA [1981]	168
3.5.3.	Enzymatische Hydrolyse mit Pektinase	168
3.6.	Sulfatierung	168
4.	Isolierung der Gallotannine	169
5.	Pharmakologische Arbeitsmethoden	170
5.1.	Zytotoxizität	170
5.2.	Phagozytose- und „oxidative burst“-Aktivität	170
5.3.	Antivirale Aktivität	171
5.4.	Antiphlogistische Aktivität	173
I	LITERATURVERZEICHNIS.....	175

A EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Wässrige Teezubereitungen waren in der Frühzeit der Arzneimitteltherapie die bevorzugte, zumeist auch einzige zur Verfügung stehende Arzneiform. Heute ist an ihre Stelle für rational einsetzbare Pflanzenpräparate die alkoholische Extraktform getreten. Der Grund für diese Entwicklung lag in der Vorstellung begründet, daß die besonders stark wirkenden niedermolekularen Pflanzenstoffe bevorzugt in Alkohol löslich sind.

Die rein wasserlöslichen Inhaltsstoffe wurden lange Zeit als nicht oder wenig wirksame Ballast- oder Reservestoffe ausgegrenzt. Seit kurzem weiß man aber, daß sich in den rein wässrigen Pflanzenauszügen neben Alkaloidsalzen weitere pharmakologisch wirksame Verbindungen befinden; hierzu gehören vor allem die wasserlöslichen Polysaccharide und Gerbstoffe. Ihre schwierig aufzuklärenden Strukturen waren ein weiterer Grund, weshalb ihre pharmakologische Untersuchung so lange auf sich warten ließ.

Von den natürlich vorkommenden und künstlich hergestellten Polysacchariden haben einige z.B. als Immunmodulatoren in der Tumor (Pilzglucane)- und Infektionstherapie (Arabinogalaktane), als Antithrombotika (Heparin) oder als Plasmaexpander (Dextrane) Eingang in die Therapie gefunden. Relativ neu sind Ergebnisse aus *in vitro*- und Tierversuchen, wonach bestimmte Polysaccharide aus niederen und höheren Pflanzen auch antiphlogistische, antivirale und antidiabetische Wirksamkeit besitzen. Ihre Wirkmechanismen sind noch unbekannt, auch haben sie therapeutisch als isolierte Reinstoffen bisher noch keine Anwendung gefunden.

Gerbstoffe zeichnen sich nach Untersuchungen der letzten 10 Jahre ebenfalls durch eine Reihe interessanter pharmakologischer Wirkungen aus. Zahlreiche Gerbstoffe besitzen antioxidative, antivirale und antiphlogistische Wirkungen, die zumindest in den *in vitro*-Versuchen den synthetischen Verbindungen an Wirkstärke nicht nachstehen.

Diese Erkenntnisse sprechen dafür, daß die Wirkung dieser Verbindungen in entsprechenden Wasser- oder Wasser-Alkohol-Extrakten mit hohem prozentualen Wasseranteil auch therapeutisch zum Tragen kommen und zusammen mit den alkohol-löslichen niedermolekularen Wirkstoffen an der therapeutischen Wirksamkeit von Wasser-Alkohol-Extraktpräparaten maßgeblich beteiligt sind.

Da systematische Untersuchungen in dieser Richtung fehlen, soll mit der vorliegenden Arbeit ein Versuch gemacht werden, einen phytochemischen und pharmakologischen Beitrag zu diesem Thema zu liefern.

Ausgewählt wurden für diese Arbeiten Pflanzen, die nach ihren beschriebenen volksmedizinischen Anwendungen immunmodulatorische, antivirale oder antiphlogistische Wirkungen erwarten ließen, bei denen aber die dafür in Frage kommenden Wirkstoffe d.h. die Beteiligung von Polysacchariden bzw. Gerbstoffen an der Gesamtwirksamkeit solcher Extrakte nicht oder nur unzureichend bekannt waren.

Zur Bearbeitung dieses Themas wurden folgende Pflanzen ausgewählt:

- *Phyllanthus amarus*
- *Mucuna pruriens*
- *Cissus quadrangularis*

Diese Drogen stammen aus dem Arzneischatz der traditionellen Medizin Indiens. Sie werden bei Hepatitis (*P. amarus*), Parkinson-Krankheit (*M. pruriens*) bzw. entzündlichen gastrointestinalen Beschwerden (*C. quadrangularis*) eingesetzt.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, die jeweiligen Hauptpolysaccharide zu isolieren, strukturell aufzuklären und weitere Informationen über die Wirkungen in verschiedenen pharmakologischen Modellen zu erhalten. Es interessierte, ob Struktur-Wirkungs-Beziehungen erkennbar sind und ob bzw. inwieweit sich die für die Pflanze bisher geltenden Anwendungsbereiche durch die Anwesenheit bestimmter Zuckerpolymere erklären lassen.

In gleicher Weise sollte untersucht werden, ob bei Vorliegen von Gerbstoffen in wässrig-alkoholischen Pflanzenextrakten mit synergistischen Effekten an der therapeutischen Gesamtwirksamkeit gerechnet werden kann.

B PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN VON PHYLLANTHUS AMARUS SCHUMACH. & THONN.

1. ALLGEMEINE ÜBERSICHT

1.1. Systematik und Verbreitung

Phyllanthus amarus SCHUMACH. et THONN. läßt sich im Pflanzenreich wie folgt einordnen [FROHNE, 1996]:

Abteilung:	Spermatophytae
Unterabteilung:	Magnoliophytinae
Klasse:	Magnoliatae
Unterklasse:	Rosidae
Ordnung:	Euphorbiales
Familie:	Euphorbiaceae
Gattung:	Phyllanthus
Art:	amarus

Die Gattung *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) besteht aus ca. 550 bis 750 Arten, die in den meisten tropischen und subtropischen Ländern vorkommen [CALIXTO, 1997, WEBSTER, 1958].

P. amarus ist weit verbreitet in Asien (z.B. Thailand, Indien), Afrika (z.B. Elfenbeinküste, Nigeria, Ghana) sowie in Nord-, Mittel- und Südamerika (z.B. Südflorida, Bahamas, Kuba, Westindische Inseln, Haiti, Costa Rica, Peru, Brasilien) [MORTON, 1985, UNANDER, 1991].

Nach HAGERS HANDBUCH [1998] ist eine Verwechslung mit *P. urinaria*, *P. debilis* KLEIN EX WILLD. und *P. fraternus* WEBSTER möglich.

Die Art *Phyllanthus amarus* wurde in der Vergangenheit, obwohl morphologisch und in der chemischen Zusammensetzung (bitterer Geschmack) deutlich von *P. niruri* verschieden, immer wieder mit dieser Art verwechselt. In der Literatur wurden sehr wahr-

scheinlich einige Inhaltsstoffe von *P. amarus* fälschlicherweise als von *P. niruri* stammend beschrieben. Da eine eindeutige Identifizierung nachträglich aufgrund fehlenden Herbarmaterials nicht mehr möglich war, mußte die Zugehörigkeit der einzelnen Inhaltsstoffe zu den beiden Arten durch erneute Analyse von genetisch gesicherten Pflanzenproben bestätigt werden.

HEUBL [2000] konnte durch eine von ihm durchgeführte DNA-Analyse (Gen-Finger-Print) an verschiedenen botanisch bestimmten Proben von *P. amarus* und *P. niruri* zeigen, daß *P. amarus* genetisch mit *P. niruri* nicht synonym ist. Bei dem Verfahren wurden an Phyllanthus-Arten vergleichende Sequenzanalysen eines nukleären Markers sowie einer weiteren unabhängigen Region in der Chlorplasten-DNA durchgeführt. Aus dem Kladogramm [HEUBL, 2000] der Phyllanthus-Arten (Abbildung 1) geht hervor, daß *P. amarus* genetisch enger mit *P. fraternus* als mit *P. niruri* verwandt ist, so daß Verwechslungen zweifelsfrei ausgeschlossen werden können.

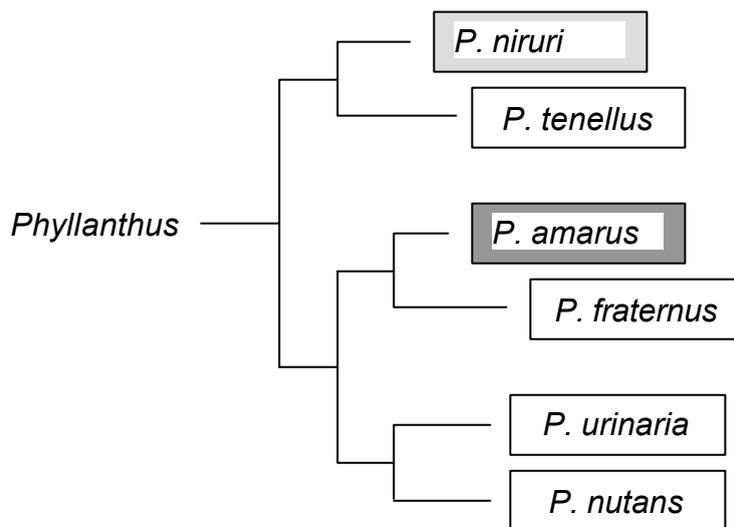


Abbildung 1: Kladogramm der Gattung Phyllanthus [HEUBL, 2000]

HEUBL [2000] konnte damit die Authentizität des eingesetzten Pflanzenmaterials auf *Phyllanthus amarus* eindeutig bestätigen.

Das Beispiel zeigt, daß für die Entwicklung eines Pflanzenpräparates die 100%ig gesicherte Authentizität des verwendeten Pflanzenmaterials eine unabdingbare Voraussetzung ist.

1.2. Botanische Beschreibung

Phyllanthus amarus ist ein monözisches oder selten diözisches, vollständig unbehaartes, aufrechtes oder aufsteigendes, einjähriges, am Grund oft verholztes Kraut mit einer Höhe von bis zu 60cm. Die aufrechten Stengel sind rund und grünlich oder rötlich. Die horizontalen Triebe sind in der Regel 12cm lang, können aber auch 18cm erreichen und sind im älteren Wachstumsstadium verzweigt mit sekundären aufrechten Trieben. Die Niederblätter sind linealisch-lanzettlich, 1mm lang und blaßgrün, während die Nebenblätter linealisch-lanzettlich, 1mm lang und cremefarben mit einer bräunlichen medianen Linie sind.

Die männliche Blüten haben einen 0,75mm langen Blütenstiel; sie weisen 5 Kelchblätter auf, die eiförmig, 0,5mm lang, spitz und blaßgrün mit weißem Rand sind; sie haben die 3 Staubblätter und Filamente, die eine Säule von einer Höhe von 0,2mm formen; die Antheren der männlichen Blüten sind ein wenig sitzend, nierenförmig und beigefarben.

Die weiblichen Blüten haben einen 1mm langen apikal verdickenden Blütenstiel mit 5, eiförmig-länglich, 0,75 bis 1mm langen, 0,3 bis 0,5mm breiten, ein wenig spitzen und gelblichgrünen und glatten Kelchblättern mit einem Durchmesser von 0,3mm; der sehr kleine und 0,1mm lange Griffel liegt frei; die Narben sind rundlich und cremefarben.

Die glatten, ocker- bis olivfarbigen Früchte sind gedrückt-dreilappig bis kugelförmig, ca. 1mm lang und ca. 2mm im Durchmesser [UNANDER, 1991] (siehe Abbildung 2).



Abbildung 2: *Phyllanthus amarus* Kraut

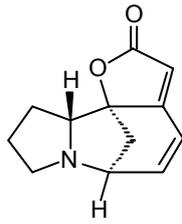
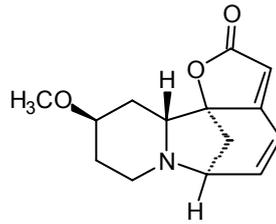
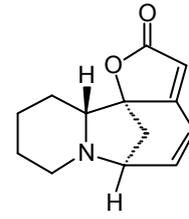
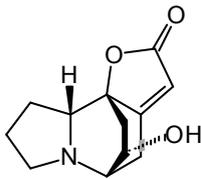
1.3. Bekannte Inhaltsstoffe

1.3.1. Niedermolekulare Inhaltsstoffe

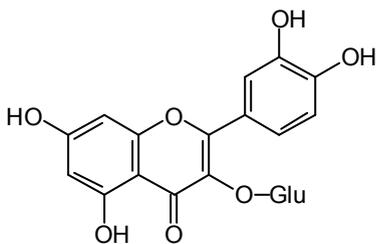
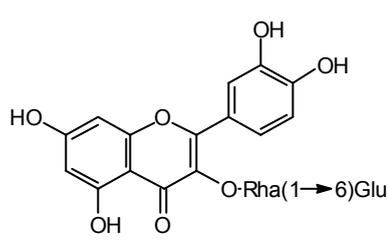
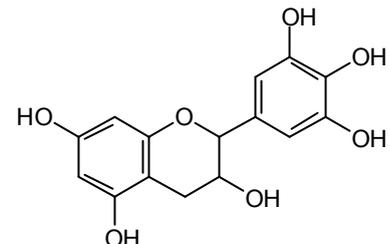
Aus *Phyllanthus amarus* wurden bisher Alkaloide, Flavonoide, Lignane und oligomere Gallotannine isoliert. Im einzelnen handelt es sich um folgende Verbindungen:

Pyrrrolizidin-Alkaloide vom Securinin-Typ

- Phyllanthine [HOUGHTON, 1996] (V 1)
- Securinin [HOUGHTON, 1996] (V 2)
- Norsecurinin [HOUGHTON, 1996] (V 3)
- Isobubbialin [HOUGHTON, 1996] (V 4)
- Epibubbialin [HOUGHTON, 1996] (V 5)

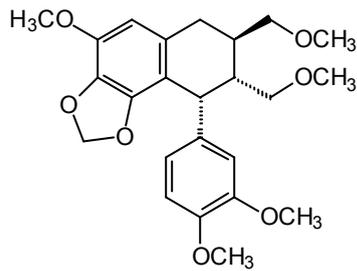
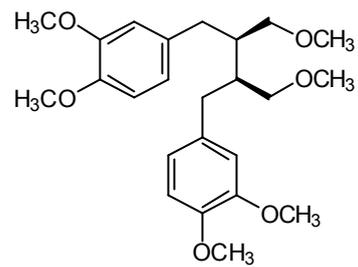
V 1V 2V 3V 4V 5Flavonoidabkömmlinge

- Quercetin-3-O-glucopyranoside [FOO, 1993] (V 6)
- Rutin [FOO, 1993] (V 7)
- Galocatechin [FOO, 1993] (V 8)

V 6V 7V 8Lignane vom Dibenzylbutan-Typ

- Hypophyllanthin [BHADBHADE, 1980, SOMANABANGHU, 1993] (V 9)
- Phyllanthin [BHADBHADE, 1980, SOMANABANGHU, 1993] (V 10)

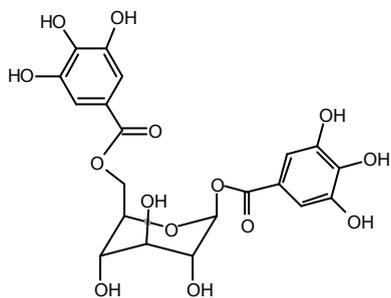
Phyllanthin ist für den bitteren Geschmack der Blattdroge verantwortlich.

V 9V 10

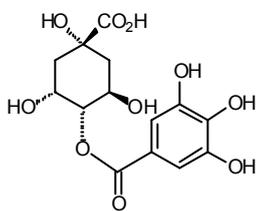
Gallo- bzw. Ellagitannine

Die Verbindungen sind mit Ausnahme der 4-O-Galloylchinasäure (V 12) und der Ellagsäure (V 18) Polyphenole, die in verschiedenartiger Weise mit einem Mol Glucose verknüpft sind, mit Molekulargewichten zwischen 170 und 1111g/mol:

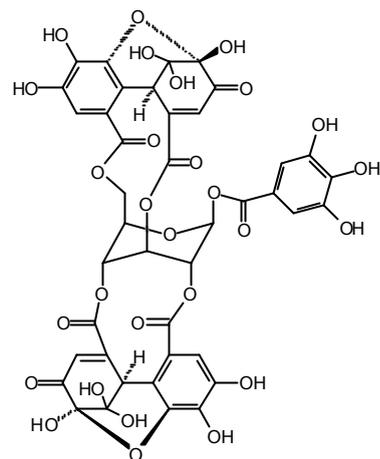
- 1,6-Digalloylglucopyranosid [FOO, 1993] (V 11)
- 4-O-Galloylchinasäure [FOO, 1995] (V 12)
- Amariin [FOO, 1993] (V 13)
- Amariinsäure [FOO, 1995] (V 14)
- Amarulon [FOO, 1993] (V 15)
- Corilagin [FOO, 1993] (V 16)
- Elaeocarpusin [FOO, 1995] (V 17)
- Ellagsäure [FOO, 1995] (V 18)
- Furosin [FOO, 1995] (V 19)
- Geraniin [FOO, 1993] (V 20)
- Geraniinsäure B [FOO, 1995] (V 21)
- Repandusinsäure A [FOO, 1995] (V 22)
- Phyllanthusiin D [FOO, 1992] (V 23)



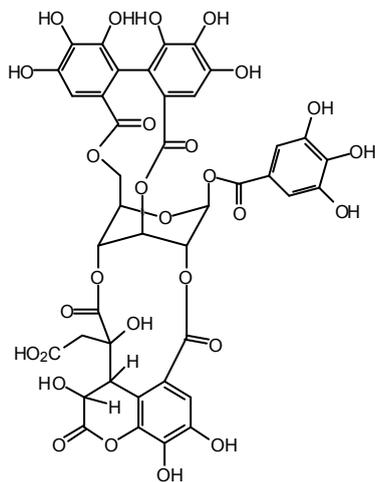
V 11



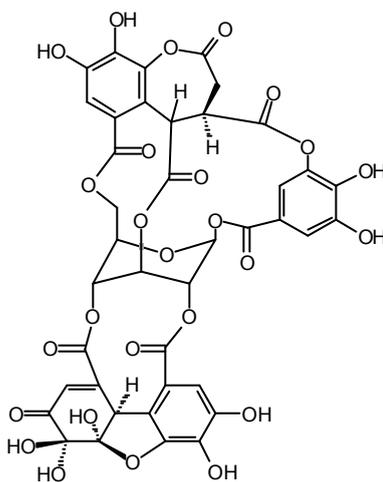
V 12



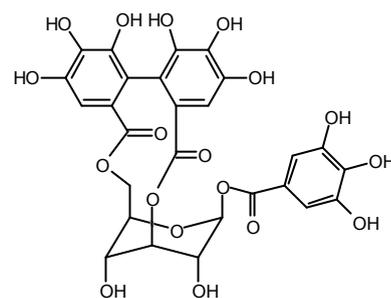
V 13



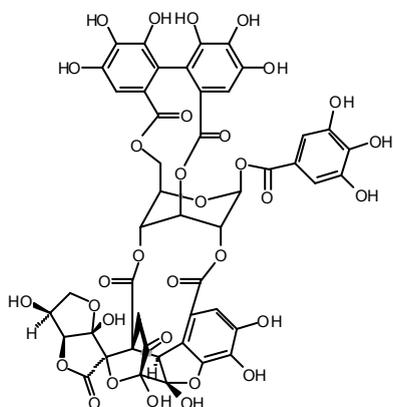
V 14



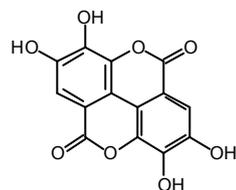
V 15



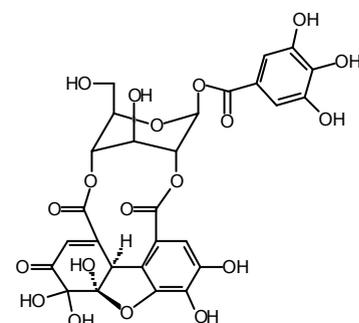
V 16



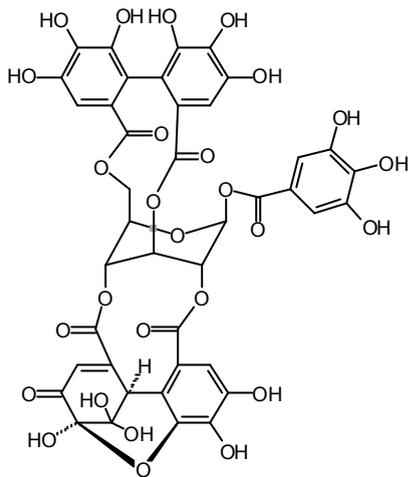
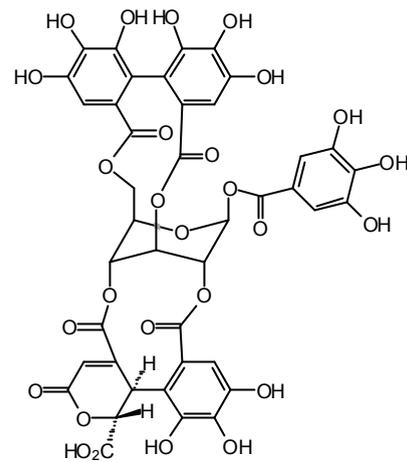
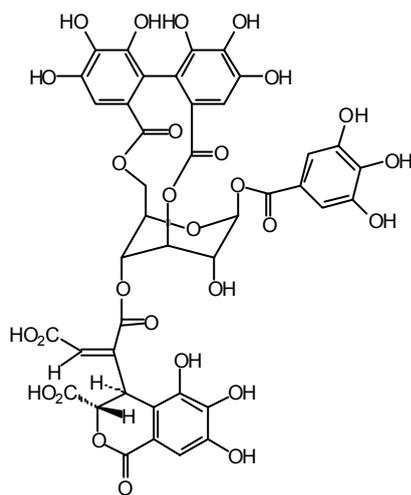
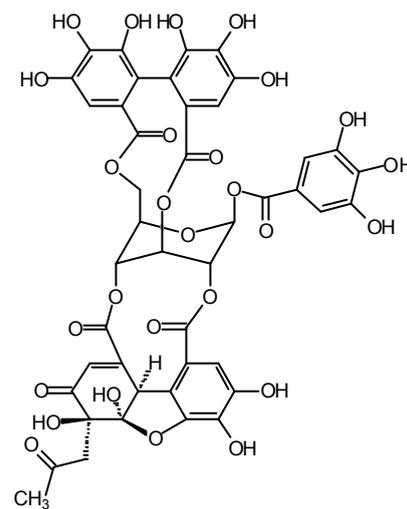
V 17



V 18



V 19

V 20V 21V 22V 23

1.3.2. Hochmolekulare Inhaltsstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polysaccharide zum ersten Mal als hochmolekulare Inhaltsstoffe in *P. amarus* isoliert und strukturell aufgeklärt.

1.4. Volksmedizinische Verwendung

Die Pflanzen der Gattung Phyllanthus wurden und werden vor allem in der Volksmedizin Indiens, Chinas und Südamerikas zur Behandlung von Leber- oder Harnblasenschädigungen, Darminfektionen, Diabetes und als Diuretikum eingesetzt. In den letzten Jahren nahm das Interesse an den Phyllanthus-Arten beträchtlich zu, nachdem vor 13 Jahren durch eine Arbeitsgruppe um den Nobelpreisträger B. S. Blumberg [THYAGARAJAN, 1988] Extrakte aus *P. amarus* auch klinisch als wirksam gegen Hepatitis B erkannt wurden. Inzwischen wurden verschiedene klinische und pharmakologische Studien durchgeführt, um das therapeutische Potential der Pflanze für neue Arzneimittel zu ergründen [CALIXTO, 1997, 1998].

1.5. Pharmakologie

In der Arbeitsgruppe THYAGARAJAN et al. [1982] wurde erstmals gezeigt, daß ein *Phyllanthus amarus* Extrakt *in vitro* die Antigenmenge des Hepatitis B Virus (HBsAg) deutlich zu senken vermag. Auf diesem Ergebnis aufbauend wurde durch Extraktgabe von *P. amarus* das analoge „wood chuck“-Virus im Serum von Waldmurmeltieren (wood chucks) sowohl im Akut- als auch im chronischen Infektionsversuch eliminiert. Mittels ELISA-Test konnten JAYARAM et al. eine signifikante Hemmung des HBsAg durch Extraktzugabe messen [CALIXTO, 1998]. LEE et al. [1996] bestätigten die Untersuchungen, da in ihren *in vitro* Versuchen der Phyllanthus-Extrakt die Polymerase-Aktivität des HBV hemmte, die episomale HBV-DNA Menge erniedrigte und die Freisetzung des Virus in das Kulturmedium unterdrückte.

Weitere Studien *in vitro* und *in vivo* zeigten die Verminderung der HBV-Replikation durch Hemmung der reversen Transkriptase und der DNA-Polymerase nach Applikation eines Extraktes aus *P. amarus*. Zudem war der Extrakt beim Menschen gut verträglich und wies keine Nebenwirkungen auf [MEHROTRA, 1988, OGATA, 1992, SHEAD, 1990, YANAGI, 1989, YEH, 1993].

BLUMBERG et al. [BLUMBERG, 1990, THYAGARAJAN, 1988] erhielten in einer mit 59 Hepatitis B Virusträgern durchgeführten Therapiestudie nach dreiwöchiger Behandlung eine Response-Rate von 60% gegenüber 3% in der unbehandelten Kontroll-

gruppe. Bei keinem Patienten, der das HBsAg nach der ersten Untersuchung verloren hatte, wurde ein Wiederauftreten des Oberflächenantigens festgestellt.

An Ratten konnten JOY et al. [1998] und RAJESHKUMAR et al. [2000] sowohl eine hepatoprotektive Wirkung bei Leberkrebsinduktion als auch eine lebensverlängernde Wirkung bei bestehendem Leberkrebs nachweisen. Sie induzierten ein hepatozelluläres Krebsgeschwür durch orale Applikation von N-Nitrosodiethylamin bei gleichzeitiger bzw. fortwährender oraler Gabe des *P. amarus*-Extraktes. Der Extrakt wirkte sowohl inhibierend auf die Krebsbildung als auch lebensverlängernd bei bestehendem Leberkrebs.

Es gab jedoch auch gegenteilige Ergebnisse:

NIU et al. [1990] fanden bei Versuchen mit Enten keine signifikante Minderung der zirkulierenden viralen DNA-Fracht (HBV) nach Applikation von Phyllanthus-Extrakt. In diesen Untersuchungen war keine Beeinflussung des Niveaus der viralen Replikation in der Leber erkennbar. Es wurde ein schwacher Effekt auf das Enten-Hepatitis B Antigen ermittelt. Auch DOSHI et al. [1994] fanden bei Gabe eines *Phyllanthus amarus* Extraktes an 30 Patienten mit diagnostizierter Hepatitis B-Erkrankung keinerlei Effekt auf das HBsAg.

Diese Diskrepanz der Ergebnisse könnte auf den Wirksamkeitsverlust bei Einsatz von Pflanzenmaterial, bei dem bereits ein Wirkstoffabbau eingetreten war, zurückzuführen sein. Als weitere Erklärungen kommen der Einsatz von botanisch nicht authentischem Pflanzenmaterial oder die abweichenden experimentellen Versuchsanordnungen in Frage. Nur kontrollierte vorklinische und klinische Studien mit authentischem Pflanzenmaterial bzw. mit unter standardisierten Bedingungen hergestellten Extraktchargen können zeigen, ob der therapeutische Einsatz des *Phyllanthus amarus* Extraktes gegen Hepatitis B Wirksamkeit zeigt und gerechtfertigt ist [CALIXTO, 1997, 1998].

Ferner wurden beim Menschen diuretische, hypotensive und hypoglykämische Effekte für einen *Phyllanthus amarus* Extrakt beschrieben [SRIVIDYA, 1995]. SANTOS et al. [2000] konnten im Mausmodell zeigen, daß ein wässrig-alkoholischer Extrakt dosisabhängig und signifikant die Schmerzempfindung hemmt. In Abhängigkeit des Versuchsmodells war die Wirkung bei intraperitonealer Gabe um bis zu 40fach stärker als bei oraler Applikation.

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN DER POLYSACCHARIDE

2.1. Isolierung und Fraktionierung des Rohpolysaccharidgemisches

Zur Isolierung der Polysaccharide aus *Phyllanthus amarus*-Kraut wurden 200g des getrockneten und gemahlten Pulvers im Soxhlet sukzessive mit Hexan, Dichlormethan und Methanol extrahiert, um lipophile und niedermolekulare Inhaltsstoffe abzutrennen. Der extrahierte Drogenrückstand wurde getrocknet und bei 90°C mit demineralisiertem Wasser im Gewichtsverhältnis 1:10 unter Rühren extrahiert, wobei durch die hohe Temperatur störende Begleitproteine denaturiert wurden. Zur Verhinderung eines enzymatischen Abbaus und bakteriellen Befalls wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur 1g Natriumazid zugegeben. Die Suspension wurde zur Abtrennung des Drogenrückstands zentrifugiert und der Überstand 72h gegen demineralisiertes Wasser bei 4°C dialysiert (Ausschlußvolumen 12-14kD). Das Dialysat wurde zentrifugiert und gefriergetrocknet. Dieses Lyophilisat entspricht dem nicht-dialysierbaren Anteil (hochmolekularer Anteil) des Heißwasserextraktes. Nach erneutem Lösen des Lyophilisats in demineralisiertem Wasser im Verhältnis 1:100 wurden durch Zugabe von Ethanol die Rohpolysaccharide ausgefällt. Dazu wurde tropfenweise das gleiche Volumen Ethanol unter Rühren bei 4°C zugegeben, das Rühren eingestellt und der Niederschlag über Nacht stehen gelassen. Nach Abzentrifugieren des Niederschlags, der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung, wurden weitere drei Volumina Ethanol auf die gleiche Weise hinzugegeben und der erhaltene zweite Niederschlag, die Rohpolysaccharid 1+4-Fällung, wie oben behandelt.

In Abbildung 3 ist das angewandte Isolierungsschema der Polysaccharide dargestellt.

Nach der Aufreinigung wurden aus den gefriergetrockneten Retentaten die Rohpolysaccharide der 1+1 und 1+4-Ethanol-Fällungen erhalten.

Isolierungsschema der Phyllanthus-Polysaccharide

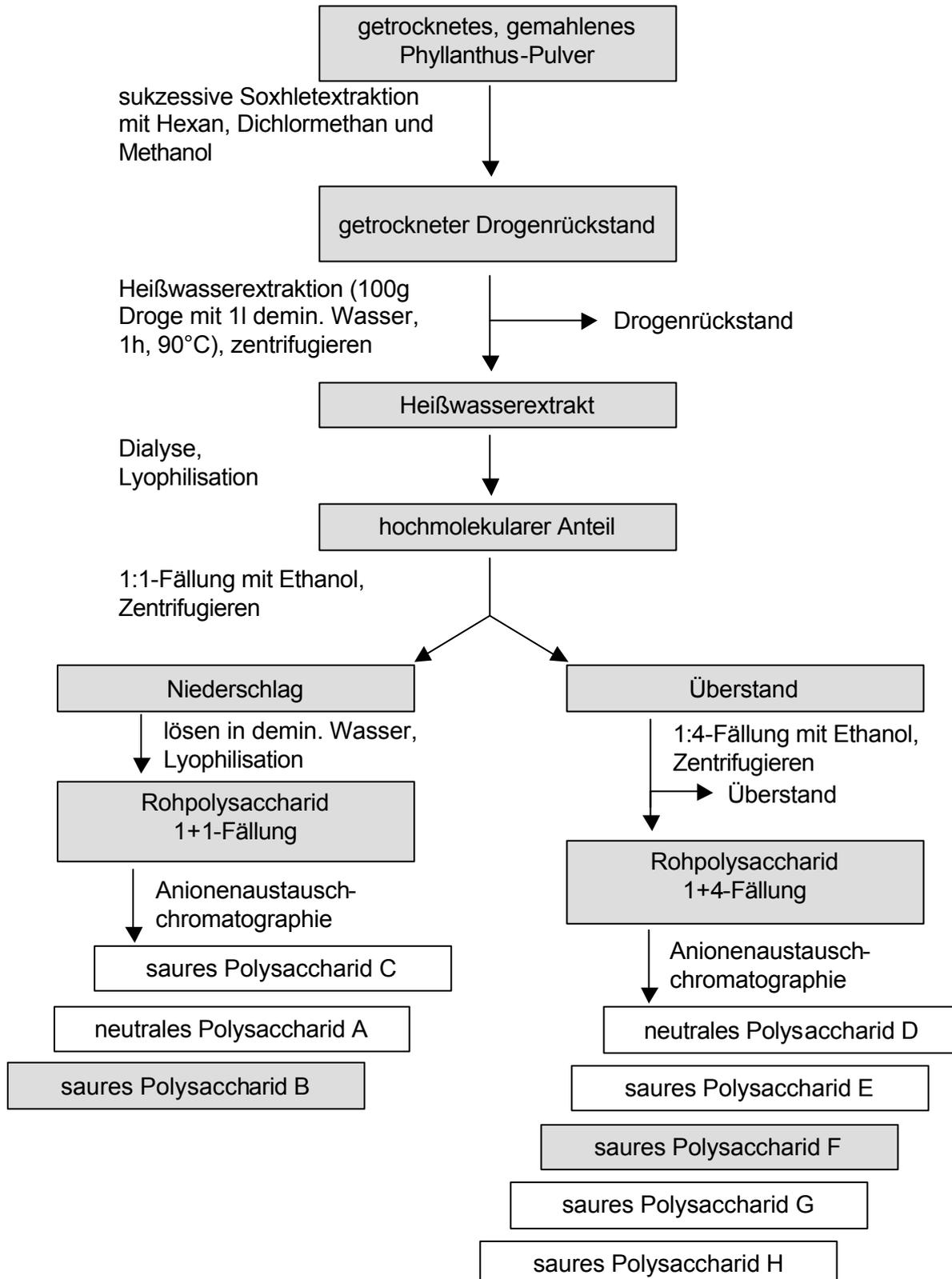


Abbildung 3: Isolierungsschema der Polysaccharide aus *Phyllanthus amarus*

In Tabelle 1 sind die Ausbeuten der verschiedenen Fraktionen zusammengestellt.

Fraktion	Menge [g]	[%]*
Hexan	14,3	7,2
Dichlormethan	1,9	1,0
Methanol	11,7	5,9
nicht dialysierbarer Anteil	2,5	1,3
Rohpolysaccharid 1+1-Fällung	1,5	0,8
Rohpolysaccharid 1+4-Fällung	0,6	0,3

Tabelle 1: Mengenverhältnisse der Fraktionen aus der Droge
(*bezogen auf 200,0g Drogematerial)

Bei Abtrennung der niedermolekularen bzw. lipophilen Anteile wurden 14,3g (7,2%) Rückstand aus der Hexan-, 1,9g (1,0%) aus der Dichlormethan- und 11,7g (5,9%) aus der Methanolfraktion erhalten. Der nicht dialysierbare Anteil betrug 2,5g (1,3%).

Die Ausbeuten, bezogen auf die eingesetzte Droge, betragen 1,5g (0,8%) für die Rohpolysaccharid 1+1- und 0,6g (0,3%) für die Rohpolysaccharid 1+4-Fällung.

2.2. Charakterisierung der Rohpolysaccharide

2.2.1. Zuckeranalyse

Zur Bestimmung der Zuckerbausteine wurden die Polysaccharide durch saure Hydrolyse zu den entsprechenden Monosacchariden hydrolisiert. Hierzu wurde 1mg Rohpolysaccharidfraktion 1h im Trockenschrank mit 2M TFA hydrolisiert. Die Monomeren wurden dünnschichtchromatographisch an Kieselgel im Laufmittel 1 und 2 aufgetrennt und mit Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure-Reagenz detektiert. Durch Cochromatographie mit Referenzzuckern konnten die in Tabelle 2 aufgelisteten Zucker nachgewiesen werden.

Rohpolysaccharid	DC-Nachweis
1+1	Galaktose, Glucose, Arabinose
1+4	Galaktose, Glucose, Arabinose

Tabelle 2: Qualitativer DC-Nachweis der Zuckermonomere in den Rohpolysacchariden

Zur Bestätigung und Quantifizierung wurden die Rohpolysaccharide mit Hilfe der Gaschromatographie untersucht. Die Rohpolysaccharide wurden wie oben beschrieben zu den Monosacchariden hydrolysiert und die Neutralzucker zu den flüchtigen Alditolacetaten derivatisiert [BLAKENEY, 1983]. Es wurden Galaktose, Glucose und Arabinose als Hauptanteile sowie Rhamnose nachgewiesen. In Tabelle 3 sind die prozentualen Anteile zusammengestellt:

Rohpolysaccharid	Neutralzuckeranteile [%]	
1+1	Rhamnose	1,4
	Arabinose	3,4
	Glucose	3,6
	Galaktose	5,6
1+4	Rhamnose	2,4
	Xylose	2,9
	Glucose	4,5
	Arabinose	11,8
	Galaktose	19,2

Tabelle 3: prozentuale Anteile der Neutralzucker in den Rohpolysacchariden

2.2.2. Uronsäureanalyse

Da bei der dünnschichtchromatographischen Neutralzuckeranalyse nach Säurehydrolyse die Zuckersäuren nicht detektiert werden können, wurden die Rohpolysaccharide mit Pektinase behandelt. Pektinase spaltet spezifisch die 1,4- α -glykosidisch verknüpften, nicht veresterten Uronsäureketten bis zur Stufe der Monomeren.

Nach der enzymatischen Spaltung wurde das Hydrolysat wie oben beschrieben detektiert. Durch Vergleich mit den Referenzsubstanzen konnte Galakturonsäure als alleinige Zuckersäure qualitativ nachgewiesen werden.

Die quantitative Uronsäurebestimmung erfolgte nach der Methode von BLUMENKRANTZ [1973], die im Vergleich zu anderen häufig benutzten Verfahren [z.B. BITTER, 1962] eine höhere Spezifität und Sensitivität aufweist.

Die Rohpolysaccharid 1+1-Fällung wies einen Uronsäureanteil von 28,8% und die 1+4-Fällung von 12,6% auf.

2.2.3. Proteingehalt

Bei der Bestimmung des Proteingehalts nach LOWRY [1951] wurde festgestellt, daß die Rohpolysaccharid 1+1-Fällung noch 18,8% Protein enthielt und die 1+4-Fällung noch 18,6%. Der erwartungsgemäß relativ hohe Proteinanteil ist auf eine noch unzureichende Aufreinigung beider Fällungen zurückzuführen.

2.2.4. High Performance Gel Permeation Chromatography (HPGPC)

Um die Zusammensetzung einer Polysaccharid-Fraktion aufzuklären bzw. zur Reinheitsprüfung des Polysaccharides, wurden die Rohpolysaccharide mittels HPGPC an einer Superose-12-Säule aufgetrennt. Über den Brechungsindex (RI) und die UV-Absorptionsmessungen erhält man Aufschluß über die Homogenität der Polysaccharide und Hinweise auf Verunreinigungen durch begleitende Proteine (UV-Absorption bei 280nm).

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte durch Aufstellen einer Eichgerade mit definierten Dextranen und Glucose als Referenzsubstanzen. Anhand der bei der HPGPC erhaltenen Retentionszeiten konnte das zugehörige Molekulargewicht ermittelt werden. Als Eluent wurde PBS-Puffer (pH 7) gewählt.

In Abbildung 4 sind exemplarisch die Brechungsindex- und UV-Chromatogramme der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung abgebildet.

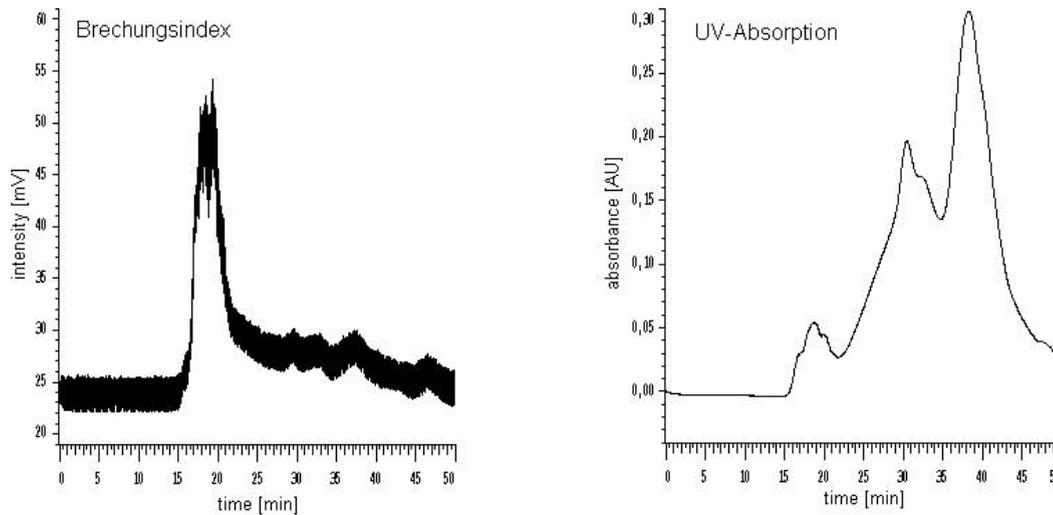


Abbildung 4: HPGPC-Chromatogramm der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung, gemessen mittels Brechungsindex und UV-Absorption ($\lambda = 280\text{nm}$)

Wie zu erwarten war und wie in den HPGPC-Chromatogrammen zu erkennen ist, besteht die Rohpolysaccharid 1+1-Fällung aus einem Gemisch verschiedener Polysaccharide, Proteine und Polyphenole (starke UV-Absorption bei $R_t = 16\text{-}45\text{min}$).

Nach dem Brechungsindex-Chromatogramm wurden im Bereich von $17,5\text{-}23,5\text{min}$, aufgrund der aufgestellten Eichgerade Polysaccharide von einer Molekülgröße von $100\text{-}500\text{kD}$ eluiert. Im niedermolekularen Bereich ($R_t > 25\text{min}$) des UV-Chromatogramms erschienen die Proteinverunreinigungen.

Eine Abtrennung der Proteinverunreinigung kann durch TCA-Zugabe und anschließende Ethanol-fällung erfolgen. Wie jedoch Vorversuche gezeigt haben, ist der Verlust an Polysacchariden bei diesem Verfahren durch die Mitfällung von Polysaccharidanteilen sehr hoch. Dies wurde durch einen positiven Zuckernachweis im Niederschlag belegt.

Eine bessere Aufreinigung und Abtrennung der Proteine mit deutlich weniger Verlusten konnte durch die Anionenaustauschchromatographie erzielt werden.

2.3. Isolierung und Charakterisierung der Hauptpolysaccharide aus den Rohpolysaccharid 1+1- und 1+4-Fällungen

2.3.1. Isolierung

Zur Trennung der Rohpolysaccharide in neutrale und saure Fraktionen sowie der Abtrennung störender Begleitproteine wurde eine Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL-6B durchgeführt.

Das Rohpolysaccharid wurde in wenig Puffer (0,01M TRIS, pH 7,2) gelöst und langsam auf die Säule gepumpt. Die neutralen Anteile wurden mit 0,01M TRIS-Puffer (pH 7,2) eluiert, wobei die geladenen sauren Anteile zunächst an das Gel binden und anschließend mit einem linearen Kochsalz-Gradienten von 0→1M NaCl eluiert werden.

Der Puffer gewährleistet eine gute Reproduzierbarkeit und verhindert Wechselwirkungen der Makromoleküle untereinander.

Bei der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung wurde nur eine geringe Menge an neutralem Polysaccharid A eluiert. Zudem konnten das saure Polysaccharid B und ein weiteres saures Polysaccharid C gewonnen werden. Alle Polysaccharide wiesen einen positiven Drehsinn auf (siehe Abbildung 5).

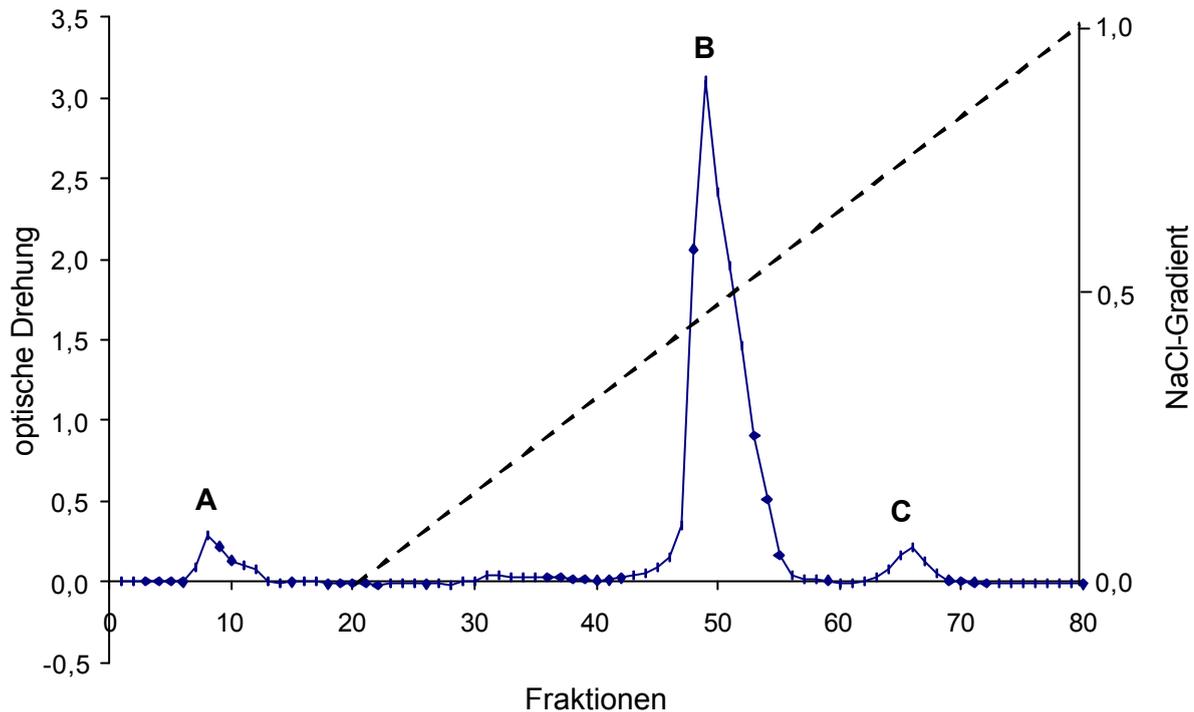


Abbildung 5: Isolierung der Phyllanthus-Polysaccharide A, B und C aus der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL 6B

Die Hauptkomponente der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung ist das saure Polysaccharid B. Die jeweiligen Ausbeuten an Polysaccharid-Komponenten sind in Tabelle 4 angegeben.

Polysaccharid	Ausbeute [mg]	[%]*
A	42,4	8,2
B	242,2	47,0
C	64,6	12,5

Tabelle 4: Ausbeuten der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung nach der Anionenaustauschchromatographie (*bezogen auf 515mg Rohpolysaccharid)

Wie aus dem HPGPC-Chromatogramm (Abbildung 6) hervorgeht, besteht das Phyllanthus-Polysaccharid B aus einem Hauptpeak mit zwei Maxima bei ca. 350kD ($R_t = 19,3\text{min}$) und 500kD ($R_t = 18,0\text{min}$). Das Molekulargewicht liegt im Mittel somit bei etwa 425kD. Die im Vergleich zur Rohpolysaccharid 1+1-Fällung geringere UV-

Absorption spricht für die gelungene starke Reduktion der Proteinverunreinigungen (vgl. Abbildung 4).

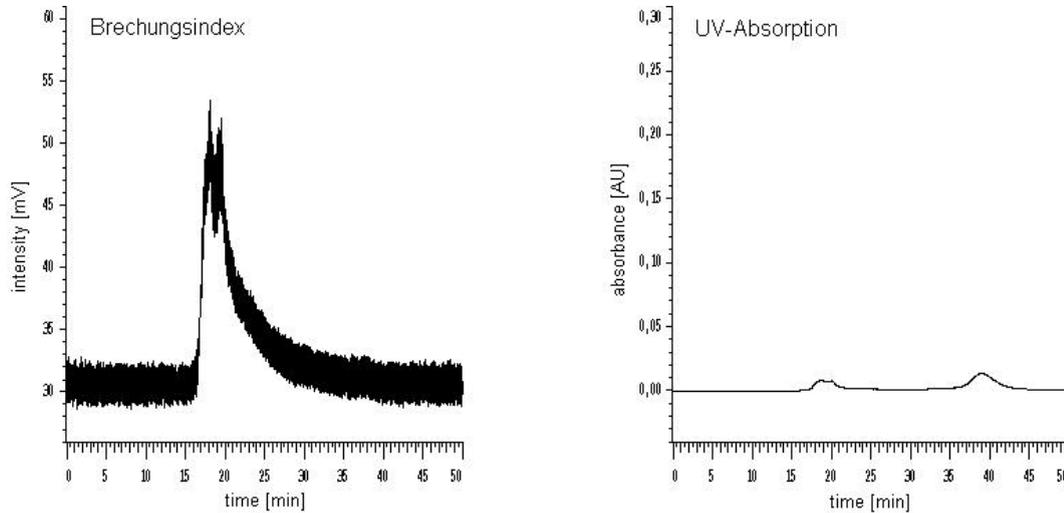


Abbildung 6: HPGPC-Chromatogramme des Phyllanthus-Polysaccharids B ($\lambda = 280\text{nm}$)

Analog wurde die Aufreinigung mit der Rohpolysaccharid 1+4-Fällung durchgeführt. Aus Abbildung 7 geht hervor, daß die Polysaccharidverteilung heterogener als in der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung ist.

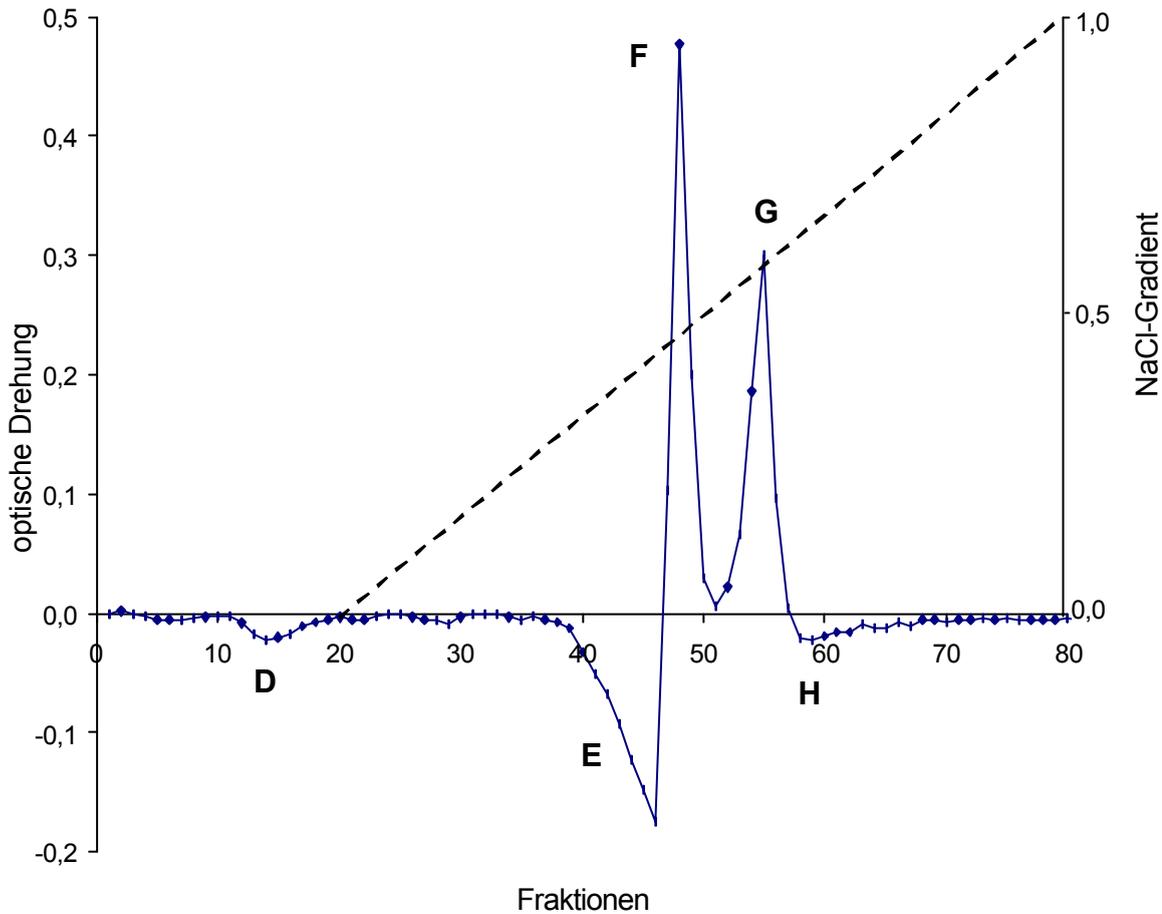


Abbildung 7: Isolierung der Phyllanthus-Polysaccharide D, E, F, G und H aus der Rohpolysaccharid 1+4-Fällung der Droge nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL 6B

Insgesamt war es durch die Anionenaustauschchromatographie möglich, mehrere neutrale und saure Polysaccharide mit unterschiedlichem optischen Drehsinn zu erhalten. Nach der Auftrennung an der Anionenaustauschsäule erwies sich das Polysaccharid F mit einem positiven optischen Drehsinn als die Hauptkomponente.

Eine Charakterisierung des Polysaccharids F wurde wegen des geringen Gesamtanteils in der Droge nicht durchgeführt.

Die Mengenangaben der einzelnen Polysaccharide sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Polysaccharid	Ausbeute [mg]	[%]*
D	31,3	8,9
E	59,2	16,9
F	143,2	40,9
G	56,3	16,1
H	52,4	15,0

Tabelle 5: Ausbeuten der Rohpolysaccharid 1+4-Fällung nach der Anionenaustauschchromatographie (*bezogen auf 350mg Rohpolysaccharid)

In Abbildung 8 sind die RI- und UV-HPGPC-Chromatogramme des Polysaccharids F abgebildet.

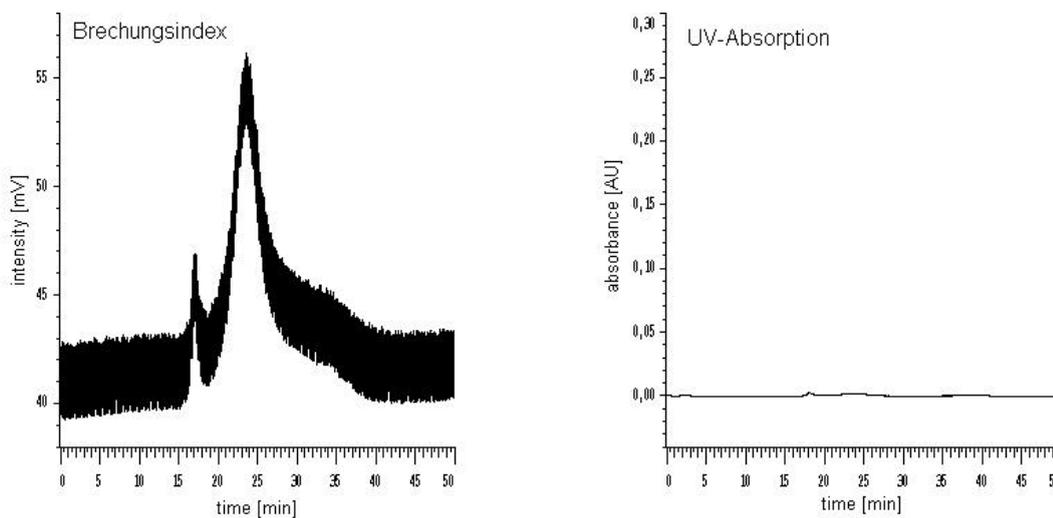


Abbildung 8: HPGPC-Chromatogramme des Phyllanthus-Polysaccharids F ($\lambda = 280\text{nm}$)

Aufgrund des Fehlens eines Signals bei 17-35min erkennt man die deutlich erfolgte Reduktion des Proteinanteils im UV-Chromatogramm. Proteine absorbieren bei $\lambda = 280\text{nm}$, Polysaccharide nicht. Im RI-Chromatogramm ist die Hauptkomponente bei 68kD ($R_t = 22,5\text{min}$) und ein geringer Teil an hochmolekularer Verunreinigung ($R_t = 17,0\text{min}$) zu sehen. Die Molekulargewichte wurden anhand einer Dextraneichgerade bestimmt.

2.3.2. Charakterisierung

Neben dem Molekulargewicht und dem Proteinanteil wurden die spezifische Drehung [nach DAB 10] und der Uronsäuregehalt [BLUMENKRANTZ, 1973] der Hauptpolysaccharide aus *Phyllanthus amarus* bestimmt. Die physikalisch-chemischen Parameter der beiden Polysaccharide B und F sind in Tabelle 6 aufgelistet.

	Polysaccharid B (Hauptpolysaccharid der 1+1 Rohfällung)	Polysaccharid F (Hauptpolysaccharid der 1+4 Rohfällung)
Proteingehalt [%] nach LOWRY	5,9	6,1
Proteingehalt durch Elementaranalyse [%]	4,9	n.b.
Uronsäuregehalt [%]	73,2	28,8
Spezifische Drehung [α] _{20°C} ^D	+133,6	+79,8
Molekulargewicht [kD]	425	68

Tabelle 6: Physikalisch-chemische Parameter der Phyllanthus-Polysaccharide der beiden Rohfällungen
n.b. = nicht bestimmt

Zur Bestätigung der Molgewichtsbestimmung nach LOWRY [1951] wurde zusätzlich eine Proteinbestimmung durch Elementaranalyse durchgeführt. Der prozentuale Stickstoffwert lieferte, mit 6,25 multipliziert, einen mit dem Wert von LOWRY gut übereinstimmenden Proteingehalt.

Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, handelt es sich bei der Komponente B um ein stark saures Polysaccharid mit einem Uronsäureanteil von über 70%. Dieses Polysaccharid kann daher der Klasse der Pektine zugeordnet werden. Das ermittelte Molekulargewicht mit ca. 425kD ist für ein pflanzliches Polysaccharid ungewöhnlich hoch.

Das Polysaccharid F besitzt ein Molekulargewicht von ca. 68kD und weist einen ähnlichen Proteingehalt auf. Der Uronsäureanteil liegt bei 28,8%.

Bei beiden Hauptkomponenten konnte der Proteingehalt anhand der UV-HPGPC-Chromatogramme durch die Anionenaustauschchromatographie um ca. 65% erniedrigt werden. Durch Abtrennung der Begleitpolysaccharide war auch in den Komponenten der Anteil der Uronsäuren stark angestiegen.

Neutralzuckeranalyse der Polysaccharide B und F

Nach Totalhydrolyse der Polysaccharide B und F mit 2M Trifluoressigsäure wurden die neutralen Zuckermonomere dünnschichtchromatographisch an Kieselgel in den unterschiedlichen Laufmitteln 1 und 2 untersucht. Nach Detektion mittels Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure-Reagenz und Cochromatographie mit Referenzzuckern konnten für beide Polysaccharide die Zucker Arabinose und Galaktose nachgewiesen werden. Nach Inkubation des Polysaccharids B mit Pektinase wurde das Dünnschichtchromatogramm der Abbildung 9 erhalten.

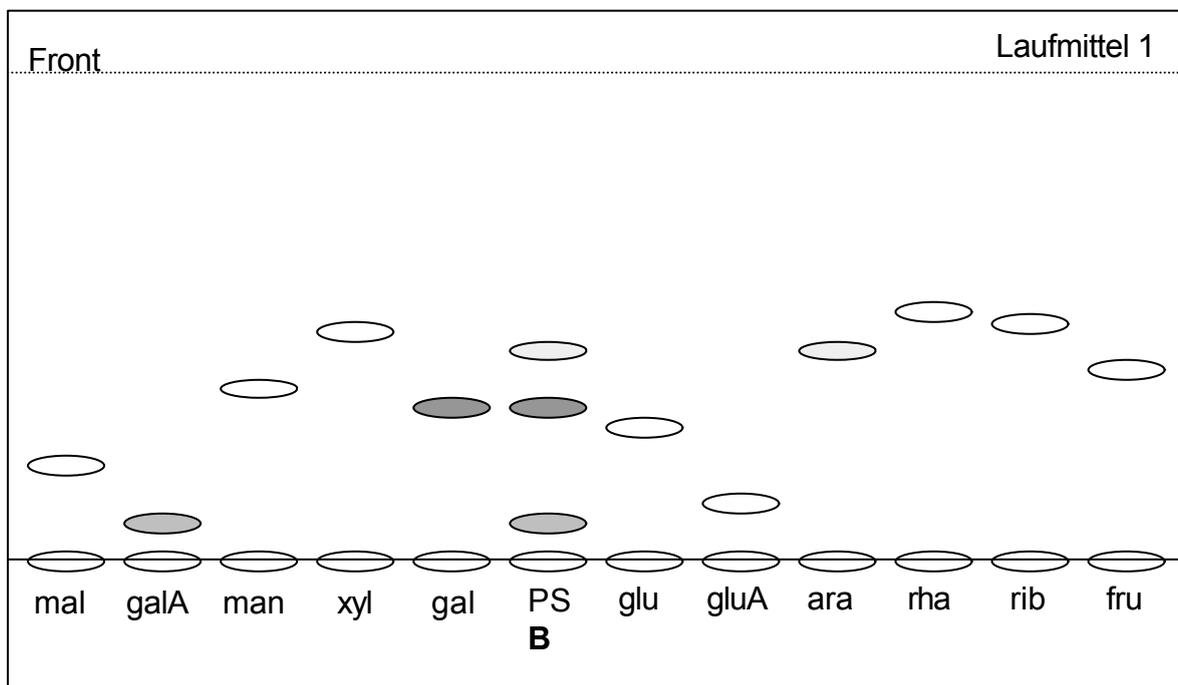


Abbildung 9: DC-Chromatogramm zur qualitativen Zuckeranalyse von dem Phyllanthus-Polysaccharid B im Laufmittel 1

Zur eindeutigen Zuordnung der Banden wurde auch im Laufmittel 2 detektiert (ohne Abbildung). Durch Vergleich mit den Referenzsubstanzen konnte eindeutig die Uronsäure im Polysaccharid B als Galakturonsäure identifiziert werden.

Da die Komponente B die mengenmäßig bedeutsamste in *Phyllanthus amarus* ist, wurden die weiteren Untersuchungen auf dieses Polysaccharid fokussiert.

2.4. Strukturaufklärung des Hauptpolysaccharids B

2.4.1. Molekülgrößenbestimmung

Nach der HPGPC-Bestimmung besitzt das Polysaccharid B eine Molekülgröße von etwa 425kD (siehe Abbildung 8, Seite 23). Zusätzlich zur relativen Größenbestimmung durch HPGPC wurde mittels AF⁴-SLS-RI die Molekülgröße bestimmt (siehe Abbildung 34, Seite 110). Als Ergebnis wurde eine Molekülgröße von 259kD mit einer geringen Verunreinigung von 3555kD (<<5%) erhalten.

Bei der Molekülmassenbestimmung mittels HPGPC handelt es sich nur um eine relative Größenbestimmung, die stark von den eingesetzten Standards abhängig ist. Wogegen bei der LASER-Lichtstreuung der Absolutwert der Molekülgröße ohne Standards bestimmt wird (siehe Kapitel E, Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung (AF4), Seite 103).

2.4.2. Neutralzuckeranalyse

Zur Bestimmung der Neutralzucker nach BLAKENEY [1983] wurde das Polysaccharid B einer Totalhydrolyse mit 2M Trifluoressigsäure unterzogen. Anschließend konnten die Zucker nach Acetylierung und Reduktion als Alditolacetate mittels GC/FID-Analytik und Vergleich mit Referenzsubstanzen quantifiziert werden. Durch Miteinwaage von Inositol als internem Standard wurden Fehler bei der Aufarbeitung kompensiert. Mittels Reduktion der Zucker zu den entsprechenden Alditolen wird eine Anomerbildung vermieden.

In Abbildung 10 ist das GC-Chromatogramm des Polysaccharids B wiedergegeben.

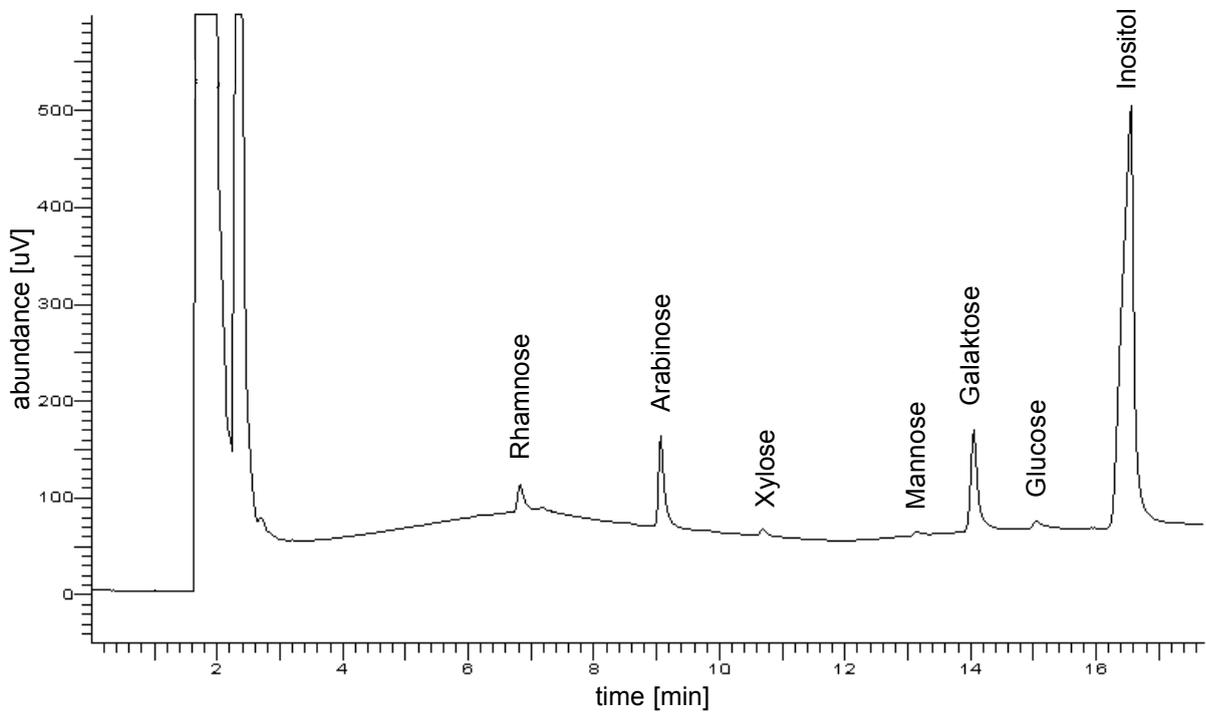


Abbildung 10: GC-Chromatogramm der Alditolacetate nach Totalhydrolyse des Polysaccharids B

Bei der wesentlich empfindlicheren gaschromatographischen Untersuchung des Polysaccharids konnten neben den Hauptbestandteilen Arabinose (9,06min) und Galaktose (14,01min) noch eine geringe Menge an Rhamnose (6,81min) und Spuren an Xylose (10,71min), Mannose (13,15min) und Glucose (15,05min) detektiert werden. Der interne Standard Inositol ist als Signal bei 16,53min zu erkennen.

Nach Erstellung einer Eichgerade der Referenzzucker konnte für das Polysaccharid B ein Neutralzuckeranteil von 12,1% bestimmt werden. In Tabelle 7 sind alle Daten prozentual zusammengefaßt.

Prozentuale Zusammensetzung	[%]
Rhamnose	2,1
Arabinose	4,1
Galaktose	5,9
Galakturonsäure	73,2
Proteine	5,9

Tabelle 7: Prozentuale Verhältnisse des Polysaccharids B

Galaktose und Arabinose bilden die Hauptbestandteile der Neutralzucker. Somit handelt es sich bei der Komponente B um ein saures Arabinogalaktan.

2.4.3. Bestimmung des Veresterungsgrades

In Polysacchariden können zwei verschiedene Arten von Estergruppierungen enthalten sein: Uronsäureester und veresterte Hydroxylgruppen.

Die Ester alkoholischer OH-Gruppen lassen sich durch Umsetzung in alkalischer Lösung mit Hydroxylamin zu Hydroxamsäuren, die mit Fe(III)-Ionen einen roten Komplex bildet, quantifizieren [McCOMB, 1957]. Die aus eventuell gleichzeitig vorhandenen Uronsäureestern entstehenden hochmolekularen Hydroxamsäuren reagieren mit den Fe(III)-Ionen zu schwerlöslichen Komplexen, die durch Filtration abgetrennt werden können. Durch diese Vorgehensweise werden selektiv nur Ester alkoholischer Hydroxylgruppen erfaßt. Uronsäureester werden über ihre nach der alkalischen Hydrolyse freigesetzte Alkoholkomponente quantifiziert.

Bei dem Polysaccharid B sind 2,2% der Hydroxylgruppen und 1,2% der Galakturonsäuren verestert.

2.4.4. Bestimmung des Restwassergehalts

Der Restwassergehalt des Lyophilisats, bestimmt mittels Karl-Fischer-Titration, betrug 9,2%.

2.4.5. Methylierungsanalysen

Die nach HARRIS [1984] im Eintopfverfahren durchführbare Methylierungsanalyse dient der Aufklärung der Verknüpfungsmuster der Monosaccharide im Polysaccharid. Dabei werden alle freien Hydroxylgruppen methyliert, das permethylierte Polysaccharid hydrolysiert und nach Reduktion der entstandenen Monosaccharid-Derivate zu den entsprechenden Alditolen alle nicht veretherten Hydroxylgruppen acetyliert [HARRIS, 1984]. Diese Vorgehensweise ist im Vergleich zu der älteren Methode nach HAKAMORI [1964] weniger zeitaufwendig und führt zu weniger Substanzverlusten. Das Schema zur Darstellung der permethylierten Alditolacetate (PMAA) ist in Abbildung 11 am Beispiel der 1,4-verknüpften Galaktopyranose wiedergegeben.

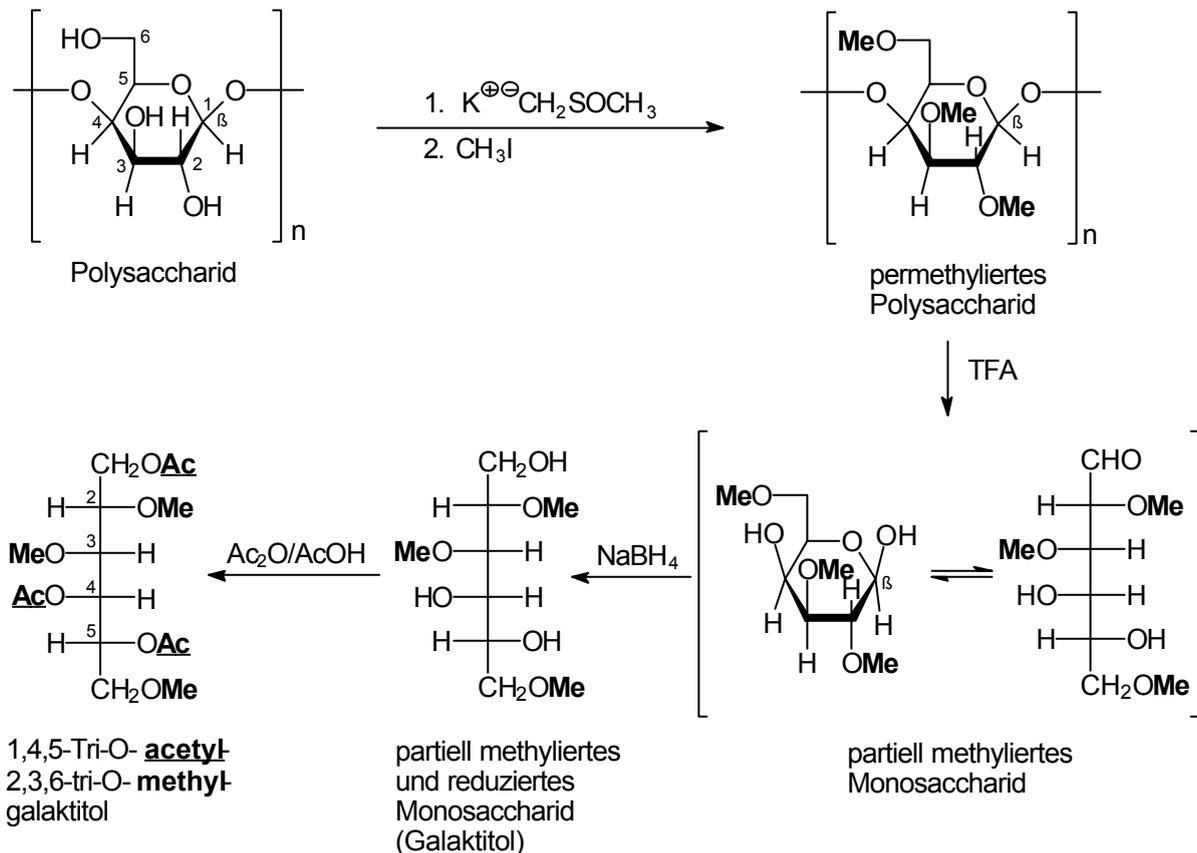


Abbildung 11: Darstellung des permethylierten Alditolacetats am Beispiel der 1,4-verknüpften Galaktopyranose

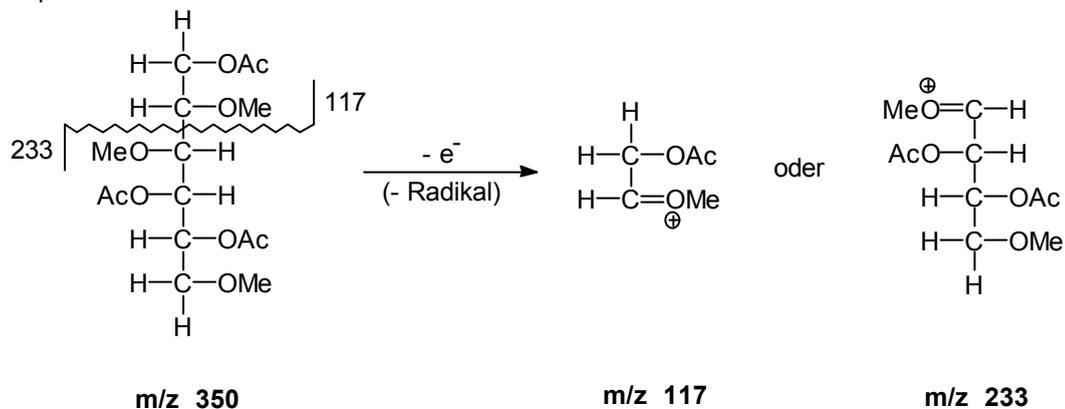
Die Identifizierung der aus der Methylierungsanalyse erhaltenen partiell methylierten Alditolacetate erfolgte nach gaschromatographischer Auftrennung durch Vergleich der

relativen Retentionszeiten und der Massenspektren mit Literaturwerten [BIERMANN, 1989, JANSSON, 1976, SELVENDRAN; 1986]. Aus der Position der Acetatreste im Monosaccharid kann auf die Verknüpfung geschlossen werden.

In Abbildung 12 ist exemplarisch die Fragmentierung von 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylgalaktitol zu sehen (das Massenspektrum des 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylgalaktitol ist in Abbildung 14 dargestellt).

Primärfragmentierung

Bsp.:



Sekundärfragmentierung

Bsp.:

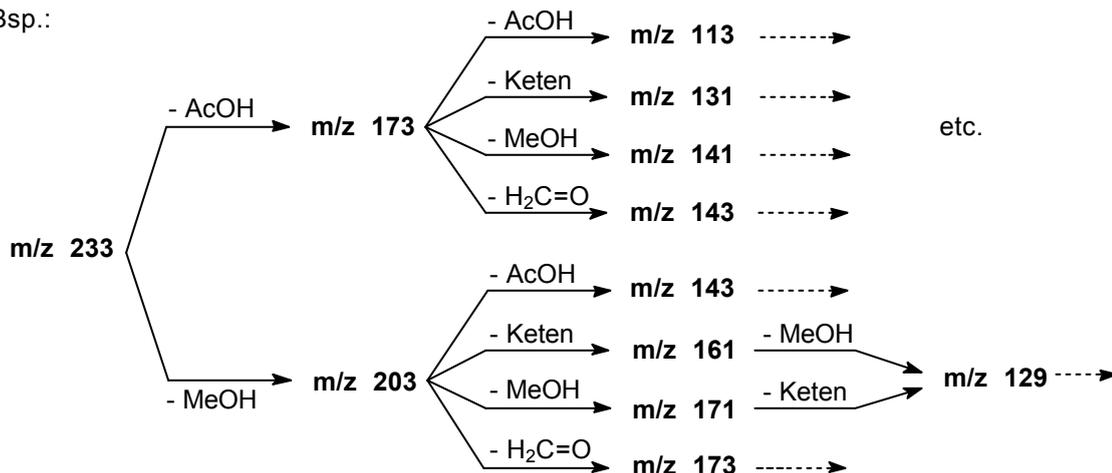


Abbildung 12: Fragmentierung von 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylgalaktitol (EI-Fragmentierung)

Prinzipiell unterscheidet man zwischen Primär- und Sekundärfragmentierung. Die Primärfragmente entstehen durch Spaltung einer C-C-Bindung im Alditolskelett.

Zuerst werden Bindungen zwischen zwei methoxylierten C-Atomen gespalten, gefolgt von dem Bindungsbruch zwischen einem methoxylierten und einem acetoxylierten C-Atom. Die Spaltung zwischen zwei acetoxylierten C-Atomen besitzt die geringste Wahrscheinlichkeit. Die Sekundärfragmente gehen durch den Verlust von AcOH (m/z 60), Keten (m/z 42), MeOH (m/z 32) und H₂CO (m/z 30) bzw. durch eine Sequenz von Abspaltungen aus den Primärfragmenten hervor. Erst nach Primärfragmentierung kann die Abspaltung eines Keten-Fragments erfolgen, da eine vorherige Bildung einer Doppelbindung Voraussetzung dafür ist. Die Abspaltungen erfolgen sowohl durch α - und β -Eliminationen als auch durch McLafferty-Umlagerungen [BJÖRNDAL, 1970, JANSSON, 1976, LINDBERG, 1972, 1981, SELVENDRAN, 1986].

Bei der gaschromatographischen Quantifizierung der Alditolacetate müssen in Abhängigkeit des Substitutionsmusters die unterschiedlich starken Detektorsignale korrigiert werden, da sich die Responsefaktoren der einzelnen C-Atomarten eines Moleküls („effective carbon response“) additiv zusammensetzen [SWEET, 1975].

Das Peakmuster der gaschromatographischen Auftrennung der partiell methylierten Alditolacetate des Polysaccharids B ist in Abbildung 13 dargestellt. Das Ergebnis und die Zuordnung der Peaks ist in Tabelle 8 wiedergegeben.

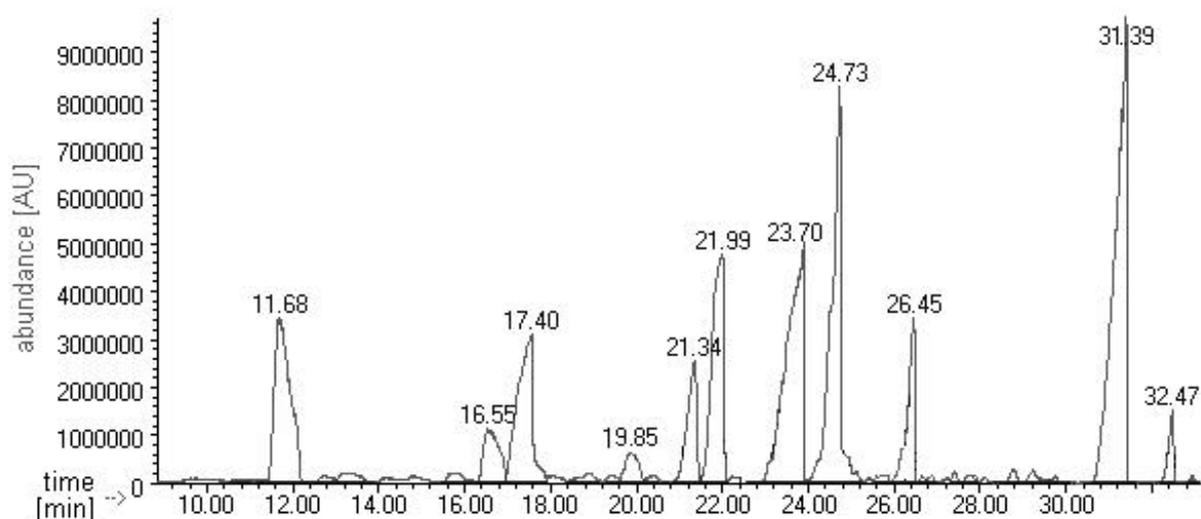


Abbildung 13: GC-Chromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate des Polysaccharids B

R _t [min]	Zusammen- setzung* [%]	partiell methylierte Alditolacetate	charakteristische Fragmente (m/z)	Zucker- verknüpfung
11,68	9,2	1,4-Di-O-acetyl-2,3,5-tri- O-methylarabinitol	161, 145, 129, 117 ^γ , 101, 87, 71	term. Arabinofuranose
16,55	3,6	1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4- di-O-methylrhamnitol	189, 173, 159, 131, 129, 115, 99, 89 ^γ , 87, 71	1,2- Rhamnopyranose
17,40	10,4	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3- di-O-methylarabinitol	203, 161, 143, 129, 117 ^γ , 113, 101, 87, 85	1,5- Arabinofuranose
19,85	1,6	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6- tetra-O-methylgalaktitol	205, 161, 145, 129, 117, 113, 101 ^γ , 87, 61	term. Galaktopyranose
21,34	5,2	1,2,4,5-Tetra-O-acetyl- 3-O-methylrhamnitol	203, 189, 149, 143, 139 ^γ , 117, 101, 99, 87, 85, 71	1,2,4- Rhamnopyranose
21,99	11,4	1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6- tri-O-methylgalaktitol	205, 161, 145, 129 ^γ , 101, 87, 71	1,2- Galaktopyranose
23,70	11,5	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6- tri-O-methylgalaktitol	233, 173, 161, 159, 157, 143, 131, 129, 117 ^γ , 113, 101, 99, 87, 75, 71	1,4- Galaktopyranose
24,73	15,7	1,3,5-Tri-O-acetyl-2,4,6- tri-O-methylgalaktitol	233, 201, 161, 159, 129, 127, 117 ^γ , 101, 99, 87, 85,	1,3- Galaktopyranose
26,45	4,2	1,5,6-Tri-O-acetyl-2,3,4- tri-O-methylgalaktitol	233, 189, 179, 161, 159, 143, 129, 117, 101 ^γ , 99, 87, 75, 71	1,6- Galaktopyranose
31,39	25,3	1,3,5,6-Tetra-O-acetyl- 2,4-di-O-methylgalaktitol	305, 245, 233, 201, 189, 159, 139, 129, 127, 117 ^γ , 101, 99, 87	1,3,6- Galaktopyranose
32,47	1,8	1,3,4,5,6-Penta-O- acetyl-2-O-methyl- galaktitol	343, 259, 253, 201, 171, 159, 157, 139, 129, 117 ^γ , 97, 87, 85	1,3,4,6- Galaktopyranose

Tabelle 8: Ergebnis der Methylierungsanalyse des Polysaccharids B
* korrigierte Werte nach SWEET [1975]
^γ Fragmente mit höchster Intensität

Aus den Daten der Methylierungsanalyse ist zu ersehen, daß der neutrale Anteil des Polysaccharids B meist aus zweifach verknüpften Galaktopyranosen (1,2-, 1,4-, 1,3-) und Arabinofuranosen (1,5-) sowie aus einem hohen Anteil an dreifach verknüpften Galaktopyranosen (1,3,6-) aufgebaut ist. Diese dreifach verknüpften Galaktopyranosen lassen auf einen hohen Verzweigungsgrad des Polysaccharids schließen. Da das Polysaccharid aber nur zu 12,1% aus den in Tabelle 8 angeführten Neutralzuckern aufgebaut ist und zu 73,1% aus Galakturonsäure, ist anzunehmen, daß die Galakturonsäure die Hauptkette des Polysaccharidskeletts bildet und die Neutralzucker in den Seitenverzweigungen angeordnet sind.

Aus Gründen der Molekülsymmetrie kann man 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methylarabinitol ($R_t = 17,40\text{min}$) und 1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4-di-O-methylarabinitol massenspektrometrisch nicht unterscheiden [BIERMANN, 1989]. Eine eindeutige Identifizierung dieses Peaks als 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methylarabinitol konnte in einer zweiten Methylierungsanalyse nach Deuteriummarkierung am C-1 unter Verwendung von Natriumbordeuterid (NaBD_4) als Reduktionsmittel erreicht werden, da hierbei eine Molekülasymmetrie erzielt wird. Anhand der beiden Bruchstücke $m/z = 118$ und 189 konnte durch das Massenspektrum der Peak bei $R_t = 17,40\text{min}$ eindeutig dem 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methylarabinitol und damit einer 1,5-verknüpften furanosidischen Arabinose zugeordnet werden.

Um zu klären, wie die Hauptkette („backbone“) des Polysaccharids aufgebaut ist, wurde eine partielle Hydrolyse durchgeführt.

2.4.6. Methylierungsanalyse des Partialhydrolysats

Da in Heteropolysacchariden die Hydrolysegeschwindigkeit glykosidischer Bindungen abhängig von der Zuckerart und -verknüpfung ist, können durch milde Säurehydrolyse leicht hydrolysierbare Zuckerreste abgespalten und durch Analyse des übriggebliebenen Gerüsts Rückschlüsse auf die Struktur des Heteropolysaccharids gezogen werden. Beispielsweise sind α -glykosidisch gebundene Zucker leichter als β -gebun-

dene und Furanoside leichter als Pyranoside zu hydrolisieren. (1→6)-Glykosidische Bindungen sind im allgemeinen hydrolyseresistenter als andere [ASPINALL, 1982].

Wie aus der Methylierungsanalyse (siehe Tabelle 9) ersichtlich ist, finden sich unterschiedlich verknüpfte glykosidische Bindungen im Polysaccharid. Daher konnte durch Ausnutzung der unterschiedlichen Hydrolyseempfindlichkeiten eine partielle Depolymerisierung durchgeführt werden, die weitere Rückschlüsse auf die Struktur des Polysaccharids zuläßt. Zu diesem Zweck wurde das Polysaccharid B 2h mit 0,05M TFA bei 121°C hydrolysiert [BUCHALA, MEIER, 1981], das Partialhydrolysat isoliert und eine Methylierungsanalyse durchgeführt.

Das Resultat der Methylierungsanalyse des Partialhydrolysats ist in Tabelle 9 wiedergegeben.

R _t [min]	Zusammen- setzung* [%]	partiell methylierte Alditolacetate	Charakteristische Fragmente (m/z)	Zucker- verknüpfung
11,68	-	1,4-Di-O-acetyl-2,3,5-tri- O-methylarabinitol	161, 145, 129, 117 ^Y , 101, 87, 71	term. Arabinofuranose
16,55	34,6	1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4- di-O-methylrhamnitol	189, 173, 159, 131, 129, 115, 99, 89 ^Y , 87, 71	1,2- Rhamnopyranose
17,40	1,2	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3- di-O-methylarabinitol	203, 161, 143, 129, 117 ^Y , 113, 101, 87, 85	1,5- Arabinofuranose
19,85	4,0	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6- tetra-O-methylgalaktitol	205, 161, 145, 129, 117, 113, 101 ^Y , 87, 61	term. Galaktopyranose
21,34	9,4	1,2,4,5-Tetra-O-acetyl- 3-O-methylrhamnitol	203, 189, 149, 143, 139 ^Y , 117, 101, 99, 87, 85, 71	1,2,4- Rhamnopyranose
21,99	5,5	1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6- tri-O-methylgalaktitol	205, 161, 145, 129 ^Y , 101, 87, 71	1,2- Galaktopyranose
23,70	7,8	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6- tri-O-methylgalaktitol	233, 173, 161, 159, 157, 143, 131, 129, 117 ^Y , 113, 101, 99, 87, 75, 71	1,4- Galaktopyranose
24,73	9,6	1,3,5-Tri-O-acetyl-2,4,6- tri-O-methylgalaktitol	233, 201, 161, 159, 129, 127, 117 ^Y , 101, 99, 87, 85,	1,3- Galaktopyranose
26,45	15,7	1,5,6-Tri-O-acetyl-2,3,4- tri-O-methylgalaktitol	233, 189, 179, 161, 159, 143, 129, 117, 101 ^Y , 99, 87, 75, 71	1,6- Galaktopyranose
31,39	12,2	1,3,5,6-Tetra-O-acetyl- 2,4-di-O-methylgalaktitol	305, 245, 233, 201, 189, 159, 139, 129, 127, 117 ^Y , 101, 99, 87	1,3,6- Galaktopyranose
32,47	-	1,3,4,5,6-Penta-O- acetyl-2-O- methylgalaktitol	343, 259, 253, 201, 171, 159, 157, 139, 129, 117 ^Y , 97, 87, 85	1,3,4,6- Galaktopyranose

Tabelle 9: Ergebnis der Methylierungsanalyse des Partialhydrolysats von dem Polysaccharid B
* korrigierte Werte nach SWEET [1975]
^Y Fragmente mit höchster Intensität

Wie zu erwarten, war es durch die partielle Hydrolyse zu einer starken Abnahme des prozentualen Anteils terminaler Zucker gekommen. Die terminale Galaktopyranose war jedoch immer noch nachzuweisen, was auf deren höhere Bindungsstabilität im Vergleich zur Arabinofuranose zurückzuführen ist.

Deutlich zu erkennen, ist die Zunahme des 1,2-Rhamnopyranose-Anteils, so daß dieser überwiegend in der Hauptkette lokalisiert sein dürfte, genauso wie der 1,6-Galaktopyranose-Anteil.

Die Abnahme der 1,2-, 1,4- 1,3- und der 1,3,6-verknüpften Galaktopyranose-Einheiten deuten auf ein vermehrtes Vorhandensein dieser Strukturelemente in den Seitenketten des Polysaccharids hin.

Zur weiteren Strukturaufklärung wurde das saure Polysaccharid reduziert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Bausteine durch Methylierungsanalyse.

2.4.7. Reduktion des Polysaccharids B mit Natriumbordeuterid

Zur Erfassung von Uronsäuren und Neutralzuckern, die glykosidisch mit Uronsäuren verknüpft sind, wurden vor der Methylierungsanalyse die Uronsäuren mit NaBD₄ zu den entsprechenden Neutralzuckern reduziert, um zu erfahren, wie hoch der genuine Neutralzucker- bzw. Uronsäureanteil ist. Durch den doppelten Deuteriumeinbau am Kohlenstoffatom C-6 erhält man eine Massenzunahme ($m/z = +2$) der deuterierten partiell methylierten Hexitolacetate, wodurch diese von den nicht deuterierten Analoga aufgrund des Massenspektrums unterschieden werden können. Anhand des Verhältnisses der partiell methylierten Hexitolacetate von dem reduzierten zu dem nichtreduzierten Polysaccharid erhält man Informationen über Art, Menge und Verknüpfungen der enthaltenen Uronsäure.

Das saure Polysaccharid B wurde nach der Methode von TAYLOR [1972] reduziert, wobei nach Aktivierung der Säuregruppen diese mit NaBD₄ zum primären Alkohol umgesetzt und analog der Methylierungsanalyse unterzogen wurden (siehe Tabelle 10).

R _t [min]	Zusammen- setzung* [%]	partiell methylierte Alditolacetate	Charakteristische Fragmente (m/z)	Zucker- verknüpfung
11,68	3,6	1,4-Di-O-acetyl-2,3,5-tri- O-methylarabinitol	161, 145, 129, 117 ^Y , 101, 87, 71	term. Arabinofuranose
16,55	4,1	1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4- di-O-methylrhamnitol	189, 173, 159, 131, 129, 115, 99, 89 ^Y , 87, 71	1,2- Rhamnopyranose
17,40	4,9	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3- di-O-methylarabinitol	203, 161, 143, 129, 117 ^Y , 113, 101, 87, 85	1,5- Arabinofuranose
19,85	1,4	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6- tetra-O-methylgalaktitol	205, 161, 145, 129, 117, 113, 101 ^Y , 87, 61	term. Galaktopyranose
21,34	4,6	1,2,4,5-Tetra-O-acetyl- 3-O-methylrhamnitol	203, 189, 149, 143, 139 ^Y , 117, 101, 99, 87, 85, 71	1,2,4- Rhamnopyranose
21,99	-	1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6- tri-O-methylgalaktitol	205, 161, 145, 129 ^Y , 101, 87, 71	1,2- Galaktopyranose
23,70	74,4	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6- tri-O-methylgalaktitol <u>und</u> 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6- tri-O-methylgalaktitol- 6,6-D ₂	235 , 233, 175 , 173, 161, 159, 157, 145 , 143, 131, 129, 117 ^Y , 115 , 113, 101, 99, 87, 75, 71, 60 , 58	1,4- Galaktopyranose
24,73	2,2	1,3,5-Tri-O-acetyl-2,4,6- tri-O-methylgalaktitol	233, 201, 161, 159, 129, 127, 117 ^Y , 101, 99, 87, 85,	1,3- Galaktopyranose
26,45	1,2	1,5,6-Tri-O-acetyl-2,3,4- tri-O-methylgalaktitol	233, 189, 179, 161, 159, 143, 129, 117, 101 ^Y , 99, 87, 75, 71	1,6- Galaktopyranose
31,39	3,6	1,3,5,6-Tetra-O-acetyl- 2,4-di-O-methylgalaktitol	305, 245, 233, 201, 189, 159, 139, 129, 127, 117 ^Y , 101, 99, 87	1,3,6- Galaktopyranose
32,47	-	1,3,4,5,6-Penta-O- acetyl-2-O-methyl- galaktitol	343, 259, 253, 201, 171, 159, 157, 139, 129, 117 ^Y , 97, 87, 85	1,3,4,6- Galaktopyranose

Tabelle 10: Ergebnis der Methylierungsanalyse des mit NaBD₄ reduzierten Polysaccharids B
Die fettgedruckten Massenfragmente stammen von dem doppelt deuterierten Kohlenstoffatom C-6

* korrigierte Werte nach SWEET [1975]

^Y Fragmente mit höchster Intensität

Durch die Reduzierung der Galakturonsäure ergaben sich folgende quantitative Veränderungen: der Anteil der 1,4-verknüpften Galaktopyranose hatte sich von 11,5% auf 74,1% erhöht, wie aufgrund des hohen Uronsäureanteils zu erwarten war.

Der Beweis für die reduzierte Galakturonsäure ist im Massenspektrum zu finden (siehe Abbildung 14).

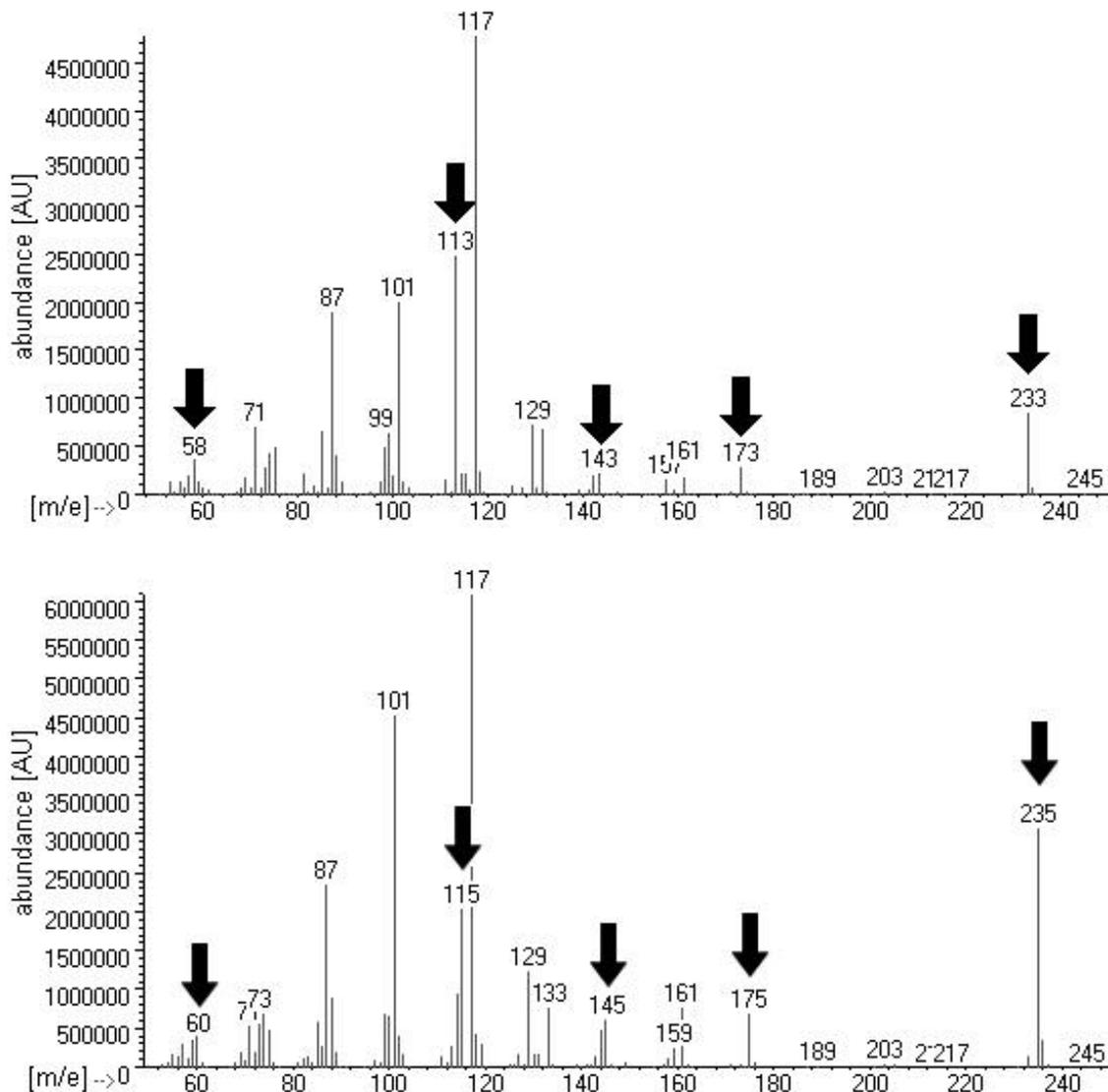


Abbildung 14: Vergleich der Massenspektren des 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylgalaktitols (oben) mit dem 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylgalaktitol-6,6-D₂ (unten) aus dem genuinen bzw. reduzierten Polysaccharid B

In den Massenspektren des 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylgalaktitols bzw. des 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylgalaktitols-6,6-D₂ ist die Massenzunahme

($m/z = +2$) durch den doppelten Deuteriumeinbau am Kohlenstoffatom C6 der reduzierten Galakturonsäure ersichtlich, wie man auch an den Fragmenten $m/z = 233/235$, $173/175$, $143/145$, $113/115$ und $58/60$ erkennen kann.

Damit war geklärt, daß die Galakturonsäure in 1,4-glykosidischer Verknüpfung vorliegen muß.

2.4.8. ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Polysaccharide erhält man bei der ^1H -NMR-Spektroskopie eine Vielzahl von sich überlagernden Resonanzen, die nicht eindeutig zugeordnet werden können. Da bei der ^{13}C -NMR-Spektroskopie bedeutend weniger Signale entstehen, die auch über einen weiteren Bereich verteilt sind, eignet sich diese Methode besser zur spektroskopischen Analyse.

Der sehr hohe Galakturonsäureanteil des Polysaccharids B führte dazu, daß nur schwache Signale detektiert werden konnten. Dies resultiert aus dem starken Quellvermögen und der dadurch eingeschränkten Löslichkeit, weshalb keine höher konzentrierte Lösung vermessen werden konnte. Das Quellvermögen in Wasser ist bei den reinen Pektinen, die ebenfalls einen hohen Uronsäuregehalt besitzen, bekannt.

- Bei den meisten Zuckern kann eine Unterscheidung zwischen ihrer α - oder β -Form im ^{13}C -Spektrum getroffen werden. So liegen die Signale der anomeren C-Atome in äquatorialer Stellung bei etwa 103-106ppm, in axialer Stellung bei etwa 98-103ppm. Aufgrund ihrer starken Tieffeldverschiebung (92-108ppm) heben sich die Signale der anomeren C-Atome von den übrigen C-Atomen (65-75ppm) ab und sind dadurch leichter zu identifizieren.
- Für die nicht-anomeren, glykosidisch gebundenen C-Atome C2-C5/6 sind Werte zwischen 80-87ppm zu finden. Im allgemeinen bewirken direkt benachbarte C-Atome eine Hochfeldverschiebung.
- Einen großen Einfluß auf die Lage der Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum haben auch die glykosidischen Bindungen, die die unmittelbar beteiligten C-Atome in das Tieffeld verschieben.

Da das Polysaccharid B eine komplexe Struktur aufweist, wurden im ^{13}C -NMR-Spektrum erwartungsgemäß eine Vielzahl sich überlagernder Signale erhalten, welche teilweise eine eindeutige Zuordnung erschweren. Zur genaueren Signalzuordnung wurde bei der Messung in D_2O als interner Standard Methanol- D_4 (Septett bei 49,01ppm) zugesetzt. Da dessen Signal bei 49,3ppm erscheinen muß, mußten alle ppm-Werte korrigiert werden [HESSE, 1991].

In Abbildung 15 ist das ^{13}C -NMR-Spektrum des Polysaccharids B abgebildet.

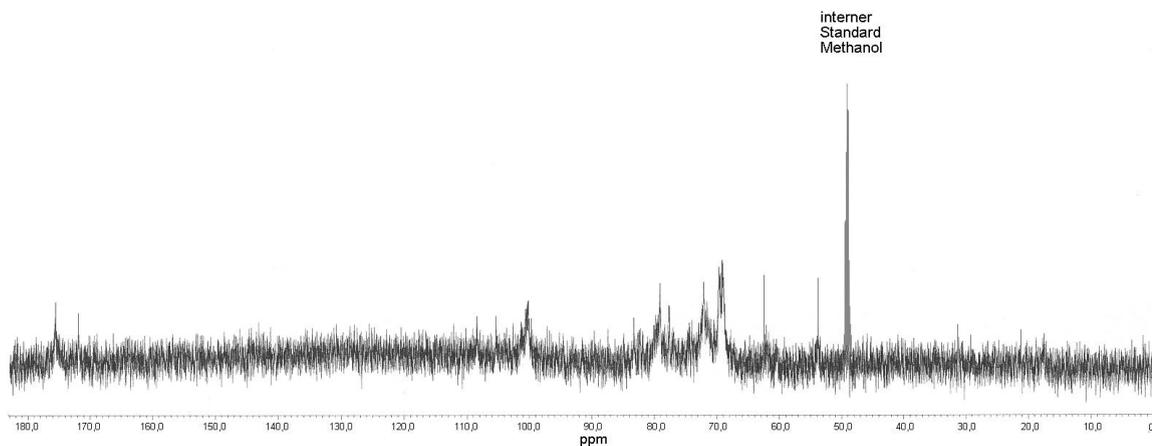


Abbildung 15: ^{13}C -NMR-Spektrum des Polysaccharids B

Durch Vergleich mit Literaturdaten konnten die Signale den verschiedenen Zuckern, zusammengefaßt in Tabelle 11, zugeordnet werden:

Zuckerverknüpfung	Verschiebungen [ppm]	Literaturwerte [ppm]	Literatur
1,4- α -D-GalpA C6	175,4	174,1 174,5-176,8	KEENAN, 1985 DAVIS, 1990
1,4- α -D-GalpA C6, verestert	171,7	171,1	KEENAN, 1985
term. α -L-Araf C1	108,1	108,3	KEENAN, 1985
term. β -D-Galp C1 1,3,6- β -D-Galp C1 1,3- β -D-Galp C1	105,2	105,1 105,1 105,5 104,9	COLLINS, 1981 KANARI, 1989 KUROKAWA, 1988 DAVIS, 1990 COLLINS, 1981
1,4- α -D-GalpA C1 1,4- α -D-GalpA C1 (verestert)	102,3	102,5 102,3	SUN, 1987 SUN, 1987
1,2 α -L-Rhap C1	101,2	101,4	SHIMIZU, 1985
term. α -D-GalpA C1 1,4- α -D-GalpA C1	100,1	100,5 100,4 99,8	SHIMIZU, 1989 GAO, 1988 SAULNIER, 1988
term. α -L-Araf C2 1,5- α -L-Araf C4 1,3- β -D-Galp C3	83,0	82,5 83,4 82,9	CAPEK, 1983 CAPEK, 1983 COLLINS, 1981
term. α -L-Araf C3	77,2	77,0	USUI, 1973
1,4- β -D-Galp C5	75,1	75,4	RYDEN, 1989
1,2- α -L-Rhap C3 term. β -D-Galp C3	71,8	71,5	SHIMIZU, 1985 RYDEN, 1989
1,2- α -Rhap C3 1,3- β -D-Galp C2	71,2	70,9 71,1	DAVIS, 1990 COLLINS, 1981
term. β -D-Galp C4 1,6- β -D-Galp C4 1,3- β -D-Galp C4	69,3	69,3/ 69,6 69,5 69,5	COLLINS, 1981 RYDEN, 1989 SRIVASTAVA, 1980 COLLINS, 1981
1,6- β -D-Galp C4 1,3,6- β -D-Galp C4	68,8	69,0 68,8	STUPPNER, 1985 STUPPNER, 1985
term. α -L-Araf C5 1,4- β -D-Galp C6	62,1	62,3 62,2	SAULNIER, 1988 DAVIS, 1990
term. β -D-Galp C6 1,3- β -D-Galp C6	61,8 61,9	61,9	RYDEN, 1989 COLLINS, 1981
Methylester	53,5	53,3	KEENAN, 1985
Acetylerster (-COCH ₃) (-COCH ₃)	20,9	21,0 20,6	KEENAN, 1985
1,2,4-Rhap C6	18,4	18,3	DAVIS, 1990

Tabelle 11: Resonanzen der C-Atome des Polysaccharids B im Vergleich zu Literaturwerten

Die Interpretation war ferner dadurch erschwert, daß die Literaturwerte zum Teil um > 2ppm voneinander abwichen.

Durch die NMR-Analyse konnte jedoch geklärt werden, welche Anomeren der bereits zugeordneten Zucker vorliegen (Tabelle 12):

Form	Zucker
a-L-	term. Arabinofuranose
a-L-	1,5-Arabinofuranose
a-L-	1,2-Rhamnopyranose
a-L-	1,2,4-Rhamnopyranose
b-D-	term. Galaktopyranose
b-D-	1,4-Galaktopyranose
b-D-	1,3-Galaktopyranose
b-D-	1,6-Galaktopyranose
b-D-	1,3,6-Galaktopyranose
a-D-	1,4-Galaktopyranosesäure
a-D-	1,4-Galaktopyranosesäure, verestert

Tabelle 12: Konfigurationszuordnung der Zuckermonomere im Polysaccharid B

Die Galaktose liegt in der β -D-, die Arabinose und Rhamnose liegen in der α -L-Form vor. Für die 1,2- und 1,3,4,6-verknüpfte Galaktopyranose gibt es keine Literaturwerte, jedoch ist ein Analogieschluß auf das Vorhandensein der β -D-Form sehr naheliegend. Anhand der zu erwartenden chemischen Verschiebungen im ^{13}C -NMR-Spektrum wären die Signale durch andere überlagert.

Die Galakturonsäure weist die α -D-Form auf. Die Signale der veresterten Galakturonsäure (Methyl- oder Acetyl-Ester) sind im Spektrum deutlich zu erkennen. Charakteristisch für eine α -D-Galakturonsäurepyranose ist das stark verbreiterte Signal bei 100,4ppm [GAO, 1988].

2.4.9. Zusammenfassung der Ergebnisse des Polysaccharids B

In der Tabelle 13 sind die Ergebnisse der Strukturaufklärung des Polysaccharids B zusammengefaßt:

Zuckerverknüpfung	Zusammensetzung des Polysaccharids B [%]*		
	genuin	partiell- hydrolysiert	reduziert
term. α -L-Arabinofuranose	9,2	-	3,6
1,2- α -L-Rhamnopyranose	3,6	34,6	4,1
1,5- α -L-Arabinofuranose	10,4	1,2	4,9
term. β -D-Galaktopyranose	1,6	4,0	1,4
1,2,4- α -L-Rhamnopyranose	5,2	9,4	4,6
1,2- β -D-Galaktopyranose	11,4	5,5	-
1,4- β -D-Galaktopyranose	11,5	7,8	74,4
1,3- β -D-Galaktopyranose	15,7	9,6	2,2
1,6- β -D-Galaktopyranose	4,2	15,7	1,2
1,3,6- β -D-Galaktopyranose	25,3	12,2	3,6
1,3,4,6- β -D-Galaktopyranose	1,8	-	-
Neutralzuckeranteil	12,1	5,7	64,3
Galaktose	5,9	3,1	52,8
Arabinose	4,1	0,1	6,0
Rhamnose	2,1	2,5	5,5
Uronsäuregehalt [%]	73,2	85	28
Uronsäureester	1,2	n.b.	n.b.
Ester der OH-Gruppen	2,2	n.b.	n.b.
Proteingehalt [%] nach LOWRY	5,9	n.b.	n.b.
Wassergehalt [%]	9,2	n.b.	n.b.
Spezifische Drehung $[\alpha]_{20^\circ C}^D$	+133,6	n.b.	n.b.
Molekulargewicht-HPGPC [kD]	425	n.b.	n.b.
Molekulargewicht-AF ⁴ -SLS [kD]	259	n.b.	n.b.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse des Polysaccharids B

n.b. = nicht bestimmt

* korrigierte Werte nach SWEET [1975]

Wie aus den Untersuchungen des genuinen Polysaccharids hervorgeht, handelt es sich bei dem Polysaccharid B um ein Pektin, das hauptsächlich aus 1,4-verknüpfter α -D-Galakturonsäure aufgebaut ist. Die unterschiedlich verknüpften Neutralzucker bestehen aus Rhamnose, Arabinose und Galaktose im Verhältnis 1:2:3.

Anhand des Ergebnisses der partiellen Hydrolyse befindet sich der Arabinose-Anteil nicht in der Hauptkette; hingegen nehmen der Galakturonsäure- und der Rhamnoseanteil zu. Dadurch wird die These gestützt, daß die Hauptkette aus Galakturonsäure, 1,2- α -L-Rhamnopyranose, 1,2,4- α -L-Rhamnopyranose und unterschiedlich verknüpften Galaktosen (siehe Tabelle 13) aufgebaut ist. Das Nichtvorhandensein bzw. der geringe Anteil der terminalen α -L-Arabino- und der 1,5- α -L-Arabinofuranose sowie verschiedener Galaktopyranosen in dem partiellen Hydrolysat belegen, daß diese in den Seitenketten vorhanden sein müssen.

Durch den Deuteriumeinbau bei der Reduzierung des Polysaccharids wurde gezeigt, daß die Galakturonsäure in der 1,4-verknüpften Form vorliegt.

Die jeweilige Zuordnung der Konfiguration (α - oder β -Form) erfolgte mittels ^{13}C -NMR. Damit ergibt sich für das Polysaccharid B aus *Phyllanthus amarus* ein Strukturaufbau wie in Abbildung 14 skizziert. Dabei ist davon auszugehen, daß die skizzierte Untereinheit in iterierter Form das Großmolekül bildet.

In der Literatur unterscheidet man bei Polysacchariden zwei Strukturtypen: Typ I mit einer linearen und Typ II mit einer hochverzweigten Hauptkette [ASPINALL, 1983]. Diese Untersuchungen zeigen das Vorliegen eines sauren Arabinorhamnogalaktans des Typs II an, was durch den hohen Anteil an 1,3,6-verknüpfter Galaktopyranose bestätigt wird (siehe Tabelle 13).

Charakteristisch für Strukturtyp II ist der Aufbau aus wechselnden Anteilen von Polygalakturonan-Regionen („smooth regions“) und „ramnified“ oder „hairy regions“, die aus Rhamnogalakturonan-Ketten mit (meist) neutralen Seitenketten aufgebaut sind [KIYOHARA, 1988]. Die Polygalakturonan-Regionen sind lineare 1,4- α -D-Galakturonsäuren-Ketten, die teilweise verestert sein können. Die Verteilung der Estergruppen scheint nicht statistisch zu sein, vielmehr gibt es Bereiche, die hochverestert sind und

andere, in denen kaum Estergruppen vorkommen [YAMADA & RA, 1989]. Die „hairy regions“ bestehen in der Regel aus 1,2- bzw. 1,2,4-verknüpften Rhamnosen und 1,4-verknüpften Galakturonsäure in unterschiedlichen Anteilen. Die Seitenketten der „hairy regions“ sind fast immer an Position 4 der 1,2-verknüpften Rhamnose der Rhamnogalakturonankette gebunden und zwar entweder direkt oder über eine 1,4-verknüpfte Galakturonsäure [KIYOHARA, 1989]. Als Seitenketten kommen häufig Arabinogalaktane, Galaktane und Arabinane vor, die über die Position 4 der 1,2-verknüpften Rhamnose verzweigt sind. Die Verzweigungen können auch von der Galakturonsäure ausgehen [ERMEL, 2000, YAMADA & KIYOHARA, 1989].

Aufgrund der Methylierungsanalyse des reduzierten und partiell hydrolysierten Polysaccharids B, dem Pektinaseabbau und dem sehr hohen Anteil an Galakturonsäure ist gesichert, daß im Polysaccharid B eine Polygalakturonsäurekette („smooth region“) vorliegen muß, sowie Bereiche in denen die (partiell verzweigte) Rhamnose der Galakturonsäure direkt benachbart vorliegt („ramnified regions“). Das Verhältnis zwischen Galakturonsäure und Rhamnose beträgt ca. 1:9, wobei ca. ein Fünftel der Rhamnosens über C-4 verzweigt ist.

Eine Seitenkette könnte ein Arabino-3,6-galaktan vom Typ II [ASPINALL, 1983] sein. Dessen Existenz ist auch durch die 1,3-Galaktopyranose-Kette mit Verzweigungen an C-6 wahrscheinlich. Da praktisch alle Arabinosen bei der Partialhydrolyse abgespalten worden waren, konnte nicht eindeutig geklärt werden, welche Bindungsart in den Seitenketten vorherrscht. Durch Vergleich mit in der Literatur beschriebenen Arabinogalaktanen lassen sich die 1,5-verknüpften Arabinofuranosen entweder dem Typ I Arabinogalaktan [ASPINALL, 1967] oder einem Arabinan des Typs I zuordnen [YAMADA & KIYOHARA, 1989].

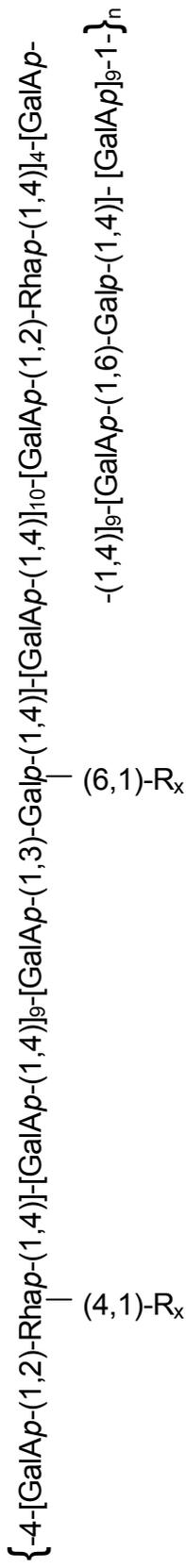
Aus dem reduzierten Anteil an zweifach verknüpften Galaktopyranosen nach der partiellen Hydrolyse kann man folgern, daß auch Galaktane als Seitenketten vorkommen. Ebenso sind Galakturonsäure-Ketten aufgrund des sehr hohen Galakturonanteils möglich, wie bereits von YAMADA et al. [1991] in dem aus *Bupleurum falcatum* L. isolierten Pektin beschrieben. Ein ähnliches Polysaccharid mit einem geringen Uronsäureanteil konnten SIERAKOWSKI et al. [1987] aus *Pereskia aculeata* isolieren. Die Hauptkette

bestand auch aus 1,4-verknüpften Galaktopyranosen. Als Seitenketten fanden sie Arabinanketten, die teilweise mit Galakturonsäuren gemischt waren. Die Rhamnose lag in 1,2-verknüpfter pyranosidischer Form in der Hauptkette vor. Aus Apfelsaft konnten BRILLOUET et al. [1996] ein Arabinogalaktan isolieren, dessen Hauptkette hauptsächlich aus 1,3- und 1,3,6-verknüpften Galaktopyranosen aufgebaut war. Der Arabinoseanteil kam nur in den Seitenketten vor und war über die Position 3 an die Galaktopyranose geknüpft. Aus *Curcuma longa* isolierten GONDA et al. [1990] ein saures Arabinogalaktan, das ein ähnliches Verknüpfungsmuster bei den Arabino-furanosen, Rhamnopyranosen, Galaktopyranosen und Galakturonsäurepyranosen besaß. Aus *Echinacea purpurea* isolierte PROKSCH [1982] ein saures Arabino-rhamnogalaktan, das sich aus Rhamnose, Arabinose, Galaktose und Glucuronsäure zusammensetzte. Die Hauptkette ähnelte im Verknüpfungsmuster teilweise dem *P. amarus*-Polysaccharid, da die Rhamnose 1,2- und 1,2,4-verknüpft und die Galaktose 1,4-verknüpft vorlag.

Die Zuordnung der terminalen Monomere zu den einzelnen Seitenketten mußte spekulativ bleiben, da das aus der Methylierungsanalyse berechnete Mengenverhältnis der endständigen Zucker aufgrund der in der Literatur [ASPINALL, 1982] beschriebenen Verluste unsicher ist.

Unter Berücksichtigung der erwähnten Literatur, der genannten Vorbehalte und der berechneten Verhältnisse der Monomere kann die folgende Struktur vorgeschlagen werden:

Hauptkette



Seitenketten

R₁ = terminale Arabinofuranose

R₂ = Arabinanketten (1,5-verknüpft)

R₃ = hochverzweigte Galaktanketten

Verhältnis

z. B.	1,2-Galp	7
	1,4-Galp	7
	1,3-Galp	8
	1,3,6-Galp	15
	1,3,4,6-Galp	1

R₄ = Arabinogalaktanketten

R₅ = Galp-GalAp-Ketten

R₆ = GalAp-Ketten

Abbildung 16: Strukturvorschlag für die Untereinheit des Hauptpolysaccharides B aus *Phyllanthus amarus*

3. SULFATIERUNG DES PHYLLANTHUS-POLYSACCHARIDS B

Polysaccharide selbst besitzen nach dem heutigen Kenntnisstand eine immunstimulierende, antiphlogistische und antidiabetische Wirkung. Wie aus zahlreichen Arbeiten bekannt ist, haben natürlich vorkommende Polysaccharidsulfate aus Algen und tierischem Material auch eine spezifische gerinnungshemmende Wirkung. Prototypen sind das Carrageenan aus der Rotalge *Chondrus crispus* oder Heparin aus tierischen Organen.

FRANZ et al. konnten anhand unterschiedlicher künstlich hergestellter Polysaccharid-Sulfate (Pullulan, Dextran oder Curdlan) in Abhängigkeit des Sulfatierungsgrads und der Molekülgröße Effekte bei der Blutgerinnung beobachten [ALBAN, 1993, SCHAUERTE, 1998, VOGL, 1996].

Weiterhin mehren sich auch die Hinweise auf eine antivirale Aktivität von sulfatierten Polysacchariden. So wurden verschiedene sulfatierte Polysaccharide mit antiviraler Wirkung aus Algen isoliert [DeCLERQ, 1993, WITROUW, 1997]. In einem zellulären Testsystem konnten RIDER et al. [1997] eine anti-HIV Wirkung von Heparin nachweisen.

Es lag daher der Gedanke nahe, daß das selbst nicht antiviral wirksame Polysaccharid B aus *Phyllanthus amarus* durch Sulfatierung in ein antiviral wirksames Polysaccharidsulfat überführt werden könnte.

Die Sulfatierung von Polysacchariden kann prinzipiell unter homogenen oder heterogenen Bedingungen durchgeführt werden. Durch die fehlende Löslichkeit vieler Polysaccharide muß teilweise in heterogenen System gearbeitet werden, wobei besonders auf die Vorbehandlung des Polysaccharids geachtet werden muß. Das Ziel ist, eine Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindungen und eine Zerstörung von vorhandener kristalliner Strukturen zu erreichen, um die Hydroxylgruppen für die Sulfatierung zugänglich zu machen.

Ein weiteres Problem ist, daß bei der Sulfatierung das Polysaccharid durch hydrolytische oder oxidative Prozesse teilweise auch abgebaut wird. Durch geeignete Wahl des Sulfatierungsreagenz gelingt es aber, genügend hohe Sulfatierungsgrade ohne massiven Kettenabbau zu erhalten. Zur milden Umsetzung wird der Lewis-Säure-

Base-Komplex SO_3 -Pyridin angewandt, der wegen seiner Kristallinität gut handzuhaben ist [GUISELEY, 1978].

Die Durchführung wurde nach dem modifizierten Verfahren von ALBAN [1993] und SCHAUERTE [1998] parallel in DMSO und DMF durchgeführt:

Das Polysaccharid B wurde im Lösungsmittel (DMSO bzw. DMF) suspendiert, im Ultraschallbad behandelt und soweit möglich in Lösung gebracht. Unter Schutzgas wurde die SO_3 *Pyridin-Lösung (in DMSO bzw. DMF) zugegeben. Nach der Umsetzung wurde das Reaktionsprodukt mit Lauge gelöst, stark verdünnt und dialysiert.

Das Molekulargewicht des in DMF aufgearbeiteten Produkts betrug ca. 30kD und für das in DMSO 3kD. Beide Werte wurden mittels HPGPC-Methode bestimmt.

Das geringe Molekulargewicht des in DMSO umgesetzten Produkts weist auf eine starke Degradierung bei der Sulfatierung hin. Auch das „DMF“-Produkt wurde hydrolytisch bei der Sulfatierung gespalten, jedoch um einen Faktor 10 weniger als das „DMSO“-Produkt.

Der Sulfatierungsgrad wurde durch Bestimmung des Schwefelgehalts mittels Elementaranalyse bestimmt. Da jede Art von Schwefel bei dieser Methode nachgewiesen wird, wurde auf eine ausreichende Dialyse bei der Aufreinigung geachtet.

In der Tabelle 14 sind die eingesetzten und erhaltenen Mengen der Sulfatierung sowie der Sulfatierungsgrad (ermittelt über Elementaranalyse) angegeben:

Lösungsmittel	Einwaage [mg]	Ausbeute [mg]	Sulfatierungsgrad*
DMF	100,0	183,6	0,95
DMSO	49,1	59,1	0,86

Tabelle 14: eingesetzte und erhaltene Mengen bei der Sulfatierung des Polysaccharids B (* über Elementaranalyse bestimmt)

Nach Umrechnen der Ergebnisse der Elementaranalyse unter Berücksichtigung der Monomerenanzahl ergab sich ein Sulfatierungsgrad von 0,95 für das „DMF“- und 0,86 für das „DMSO“-Produkt; d.h. daß bei der Umsetzung des Polysaccharids in DMF im Durchschnitt fast jedes Monomer einfach und bei dem in DMSO 6 von 7 Monomeren sulfatiert wurden.

4. ISOLIERUNG VERSCHIEDENER GALLOTANNINE

In wässrigen bzw. wässrig-ethanolischen Extrakten von *Phyllanthus amarus* liegen neben hochpolymeren Polysacchariden auch Tannine vor. Deshalb sollte geklärt werden, ob die immunstimulierende bzw. antivirale Wirkung nur auf die Zuckerpolymere zurückzuführen ist oder ob auch die Tannine daran beteiligt sind.

In der Literatur werden einige Tannine als antioxidativ, immunstimulierend, antitumoral oder antiviral wirksam beschrieben, z.B. in Schwarztee (*Camellia sinensis*), in Melisse (*Melissa officinalis*) oder im Tormentillwurzelstock (*Potentilla erecta*) [BÜECHI, 1998, LUND, 1985].

Da aus der Literatur bekannt war, daß *Phyllanthus amarus* Tannine enthält, wurde zur Prüfung auf deren antivirale Aktivität und zur Reinstoffisolierung ein methanolischer Extrakt hergestellt [CALIXTO, 1997]:

Extraktbereitung

Die getrocknete gepulverte Droge (125,1g) wurde mit Methanol erschöpfend extrahiert. Nach Abtrennung des Drogenpulvers wurde das Filtrat zur Trockne eingeeengt. Die Ausbeute an Methanoltrockenextrakt betrug 24,5g (19,6%). Zur Anreicherung der Gallotannine wurde der Extrakt portionsweise in Wasser digeriert und die vereinigten wässrigen Phasen erschöpfend gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. Hierdurch wurden Chlorophyll und andere lipophile Verbindungen abgetrennt. Alle wässrigen Phasen wurden vereinigt und eingeeengt. Nach Lyophilisation wurden 14,3g (11,4%) angereicherter Gallotanninenextrakt erhalten.

4.1. Charakterisierung

Dünnschichtchromatographie

Zur dünnschichtchromatographischen Untersuchung wurden der Methanolextrakt und die angereicherte Gallotanninfraktion im Laufmittel 3 entwickelt. Anschließend wurde mit Eisen(III)chlorid-Lösung detektiert.

Bei der Auswertung (*vis*) waren im R_f -Bereich von 0,04 bis 0,63 der DC-Platte zahlreiche blaue Zonen zu erkennen, die von den Gallotanninen bzw. anderen phenolischen Verbindungen stammten. Mit Eisen(III)chlorid-Reagenz konnten im Methanolextrakt drei Banden intensiv blau angefärbt werden. Diese lagen bei $R_f = 0,19$, bei $R_f = 0,26$ und bei $R_f = 0,39$.

HPLC

Nach dem Clean-up konnten im HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extraktes eine Hauptkomponente bei $R_t = 18,2\text{min}$, Nebenkomponten bei $R_t = 15,8\text{min}$ und $R_t = 25,4\text{min}$, außerdem einige Komponenten im Bereich von $R_t = 45-47\text{min}$, in dem die Lignane eluieren, detektiert werden. Gallussäure ($R_t = 2,8\text{min}$) und Gallussäuremethylester ($R_t = 9,6\text{min}$) sowie β -Sitosterol ($R_t = 55,2\text{min}$; nur bei 200-210nm detektierbar) waren nur in geringen Mengen vorhanden.

Aufgrund der unterschiedlichen molaren Extinktionskoeffizienten der Verbindungen kann keine quantitative Aussage getroffen werden.

Im Gallotannin-angereicherten Extrakt konnten die gleichen Hauptkomponenten der Gerbstoffe nachgewiesen werden. Die Lignane ($t > 43\text{min}$) waren quantitativ stark reduziert.

Die HPLC-Chromatogramme des methanolischen und des Gallotannin-angereicherten Extraktes sind in Abbildung 17 dargestellt.

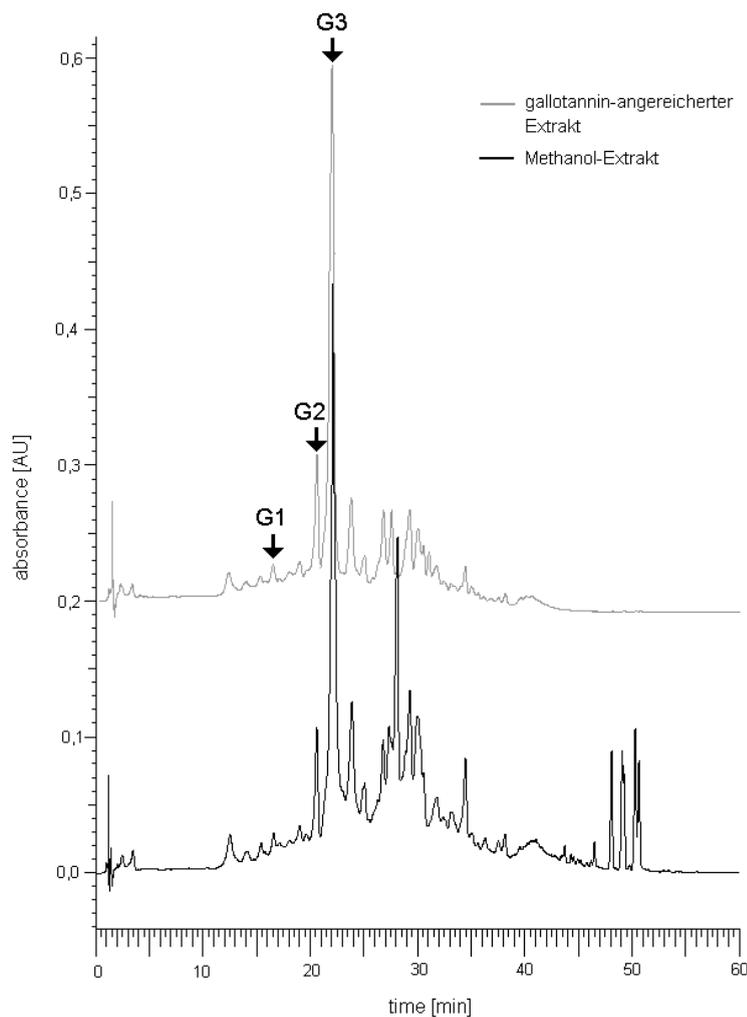


Abbildung 17: HPLC-Chromatogramme des methanolischen und des Gallotannin-angereicherten Extraktes

4.2. Isolierung

Die Auftrennung der Gallotanninfraktion wurde durch isokratische Elution an Sephadex LH 20 nach den Angaben von OKUDA et al. [1995] durchgeführt (siehe Tabelle 15). Hierbei konnten drei Verbindungen (G1-3) rein isoliert werden.

Substanz	Elutionsmittel	Detektion [nm]
G 1	20% wässriges Methanol	365
G 2	50% wässriges Methanol	280
G 3	80% wässriges Methanol	280

Tabelle 15: Parameter zur Isolierung der Komponenten

Da es sich bei der Trennung an Sephadex LH20 um eine Größenfiltrationschromatographie handelt, war anzunehmen, daß es sich bei der Komponente G 1 um die Verbindung mit dem kleinsten Molekulargewicht und bei G 3 um eine Verbindung mit höherem Molekulargewicht handelte.

4.3. Identifizierung

Die Strukturaufklärung bzw. Identifizierung der Verbindungen G 1, G 2 und G 3, die rein isoliert werden konnten, erfolgte durch Massenspektrometrie, ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie durch Vergleich der Daten mit bekannten Literaturangaben. Dadurch konnten die Verbindungen G1-3 den folgenden Verbindungen zugeordnet werden:

- G 1 = Brevifolincarbonsäure (M = 292,2g/mol)
- G 2 = Corilagin (M = 634,5g/mol)
- G 3 = Geraniin (M = 952,7g/mol)

Die jeweilige Zuordnung der ^{13}C -NMR-Spektren sowie die MS-Daten sind im Vergleich zu den Literaturdaten in Tabelle 16 zusammengefaßt.

Brevifolincarbonsäure (G 1)			Corilagin (G 2)			Geraniin (G 3)		
C ₁₃ H ₈ O ₈ (M=292,2g/mol)			C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈ (634,5g/mol)			C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇ (952,7g/mol)		
	Lit. ²	Exp.		Lit. ^{1,3}	Exp.		Lit. ^{1,3}	Exp.
FAB-MS [M-H] ⁻	291	291,4	FAB-MS [M-H] ⁻	633	633,6	FAB-MS [M-H] ⁻	951	951,6
¹³ C-NMR C-Atom	Verschiebung [ppm]		¹³ C-NMR C-Atom	Verschiebung [ppm]		¹³ C-NMR C-Atom	Verschiebung [ppm]	
	[in DMSO-D ₆]			[in Aceton-D ₆]			[in Aceton-D ₆]	
1	173,4	172,3	glu1	95,0	94,2	glu1	90,8	90,7
2	41,7	42,2	glu2	69,2	69,0	glu2	72,7	72,7
3	37,4	37,2	glu3	70,7	70,7	glu3	70,7	70,6
4	194,3	194,8	glu4	62,5	62,2	glu4	65,9	66,0
4a	149,0	148,2	glu5	76,0	75,7	glu5	63,3	63,3
4b	115,4	115,4	glu6	64,8	64,3	glu6	63,8	63,7
6	160,7	160,8	A1	121,6	120,8	A1	120,2	120,3
6a	112,8	112,5	A2,6	111,7	110,8	A2,6	110,9	110,9
							110,5	110,6
7	108,1	107,9	A3,5	146,3	145,8	A3,5	146,0	146,0
							145,2	145,3
8	144,3	142,5	A4	140,2	139,3	A4	139,9	139,8
9	141,5	142,5	A C=O	166,3	165,2	A C=O	168,4	168,4
10	146,1	145,4	B,C 1	117,3	116,5	B,C 1	117,2	117,2
				116,7	115,9		115,8	115,9
10a	140,1	140,9	B,C 2	126,5	125,5	B,C 2	125,6	125,6
					125,7		124,6	124,6
			B,C 3	111,1	109,9	B,C 3	110,6	110,7
				109,1	108,1		108,0	107,9
			B,C 4,6	145,2	145,3	B,C 4,6	145,8	148,8
					144,9		145,5	145,4
					144,9		145,1	145,1
					144,8		145,0	145,0
			B,C 5	138,1	136,7	B,C 5	137,9	137,8
				137,6	137,2		136,6	136,5
			B,C	169,8	168,7	B,C	166,1	166,2
			C=O	168,4	167,2	C=O	165,4	165,5
						D1	115,3	115,2
						D2	119,4	119,3
						D3	113,5	113,4
						D4	144,6	144,6
						D5	139,0	138,9
						D6	143,4	143,3
						E1	46,2	46,3
						E2	154,5	154,6
						E3	128,6	128,6
						E4	191,8	191,8
						E5	96,3	96,3
						E6	92,5	92,5
						D,E	165,6	164,7
						C=O	164,8	164,8

Tabelle 16: ¹³C-NMR- und MS-Daten der Verbindungen G1-3 [¹FOO, 1993, ²NAWWAR, 1994, ³YOSHIDA, 1980]

A, B, C, D, E sind die jeweiligen Benzolringe und C=O die C-Atome der zugehörigen Ester (siehe Abbildung 18)

Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten stimmen mit den Werten aus der Literatur überein (nicht gezeigt). In Abbildung 18 sind die Strukturformeln der Verbindungen Brevifolincarbonsäure (G 1) und der Gallotannine Corilagin (G 2) sowie Geraniin (G 3) zusammen mit der C-Atom-Nummerierung abgebildet.

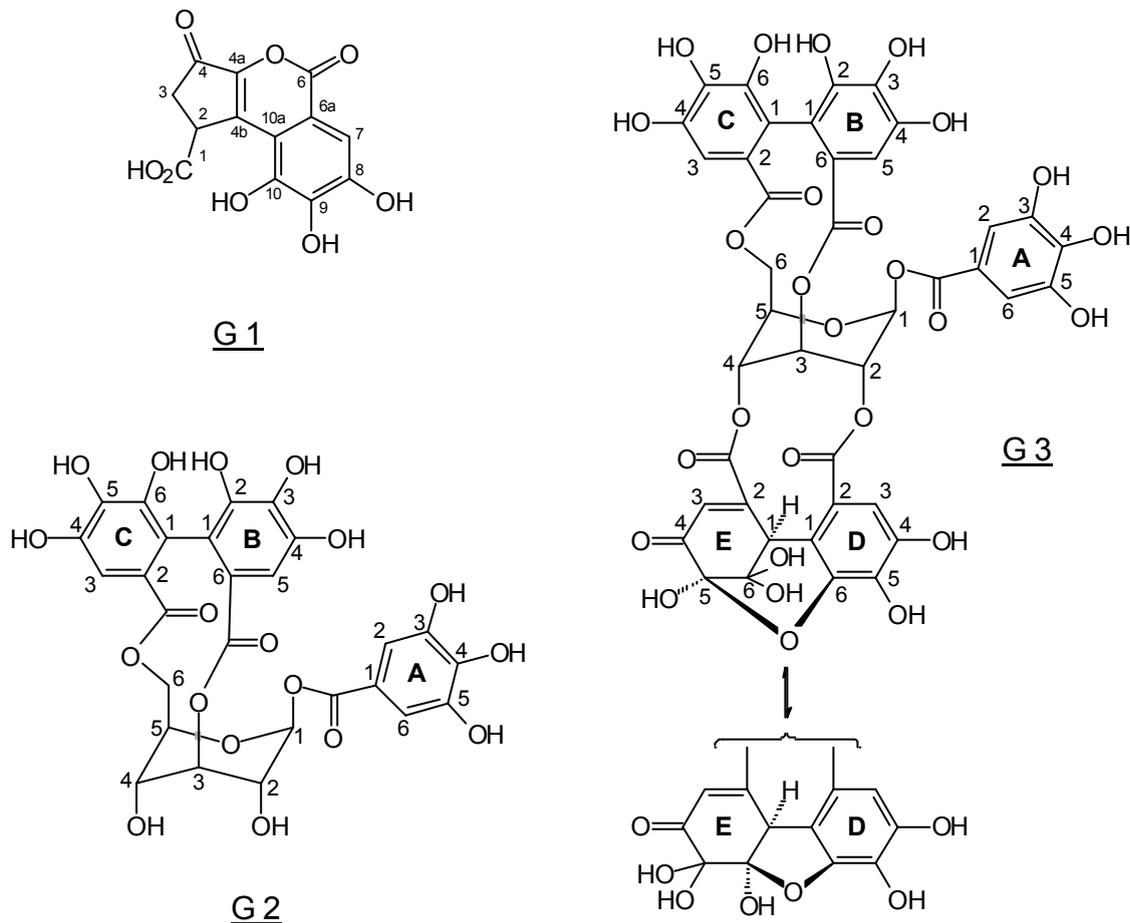


Abbildung 18: Strukturformel der Brevifolincarbonsäure (G 1) und der Gallotannine, Corilagin (G 2) und Geraniin (G 3) (mit C-Atom-Beschriftungen)

Corilagin (G 2) und Geraniin (G 3) waren als Inhaltsstoffe von *Phyllanthus amarus* bereits bekannt; Brevifolincarbonsäure (G 1) wurde erstmals nachgewiesen.

4.4. Pharmakologie

Aus der Literatur ist bekannt, daß Gallotannine antivirale Wirksamkeit besitzen. Hydrolysierbare Gerbstoffe hemmen *in vitro* das Wachstum von *Herpes simplex*-Viren. Einige Ellagitannine erwiesen sich als wirksame Hemmer der HIV-Vermehrung, wohingegen kondensierte Gerbstoffe und niedermolekulare Polyphenole wirkungslos waren. Die Wirksamkeit basiert wahrscheinlich auf der Hemmung der reversen Transkriptase, da diese sie für mehrere hydrolysierbare Gerbstoffe am Immunschwächevirus nachgewiesen werden konnte [BÜECHI, 1998, NONAKA, 1990, OKUDA, 1995, SCHOLZ, 1994, VLIETINCK, 1998].

Verfahren

Die Prüfung erfolgte analog zu den in Kapitel F3. (Seiten 124ff) beschriebenen Verfahren.

Ergebnisse

In den eingesetzten Konzentrationen waren Corilagin und Geraniin nicht zytotoxisch.

Die Replikation der HIV-1-Viruslinie wurde im MAGI-Assay durch Corilagin und Geraniin stark gehemmt. Die EC_{50} -Werte für Corilagin waren $3,5\mu\text{M}$ und für Geraniin $1,0\mu\text{M}$. Die reverse Transkriptase (RT)-Aktivität von HIV-1 wurde durch Corilagin und Geraniin inhibiert. Corilagin hatte einen IC_{50} -Wert von $2,67\mu\text{M}$ und Geraniin von $1,91\mu\text{M}$.

Die Ergebnisse bestätigen die antivirale Aktivität der Gallotannine. NAKASHIMA et al [1992] untersuchten verschiedene Tannine und konnten eine starke anti-HIV Aktivität nachweisen. XU et al. [2000] konnten zeigen, daß Corilagin stark anti-HIV-1 wirksam ist. Die antivirale Aktivität von Corilagin und Geraniin wurde von CHEN LIU et al. [1999] auch an Epstein-Barr-Viren gezeigt.

Die ermittelten IC_{50} -Werte liegen in dem für Tannine üblichen Bereich. Beispielsweise sind die IC_{50} -Werte für die Gallotannine Putranjivain A, Punicacortein C oder Punicalin 3, 5 und $8\mu\text{M}$. Auch die erhöhte Wirksamkeit des größeren Geraniins stimmt mit der Vorstellung überein, daß Gallotannine mit hohem Molekulargewicht stärker wirksam sind als kleinere [MATTHEE, 1999].

Die Untersuchungen bestätigen erneut, daß aus der volksheilkundlichen Therapie mit Teezubereitungen (= Wasserextrakt) nach wie vor entscheidende Hinweise für die Suche nach neuen Arzneistoffen mit großem pharmakologischen und therapeutischen Potential gewonnen werden können.

Obwohl Teezubereitungen heute nicht mehr als rational anwendbare Therapeutika angesehen werden können, da sie sehr schwer standardisierbar sind, wird dieser Erkenntnis auch heute noch dadurch Rechnung getragen, daß die meisten auf dem Markt befindlichen Monoextraktpräparate selten reine Alkohol- sondern Alkohol-Wasser-Extrakte mit ca. 40-60%igem Wasser-Anteil sind.

C PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN VON *MUCUNA PRURIENS* L.

1. ALLGEMEINE ÜBERSICHT

1.1. Systematik und Verbreitung

Mucuna pruriens (L.). DC. wird systematisch wie folgt eingeordnet [FROHNE, 1996]:

Abteilung:	Spermatophytae
Unterabteilung:	Magnoliophytinae
Klasse:	Magnoliatae
Unterklasse:	Rosidae
Ordnung:	Fabales
Familie:	Fabaceae
Gattung:	Mucuna
Art:	pruriens

Der Name der Familie „Mucuna“ wurde erstmals im Jahre 1648 von Marggraf für eine brasilianische Spezies geprägt. „*Pruriens*“ bezieht sich auf die feinen Härchen der Früchte, die auf der Haut stark jucken und zu Hautirritationen führen können.

Es gibt zahlreiche Synonyme für *Mucuna pruriens* (L.): *Dolichos pruriens* L. oder im englischsprachigen Raum „cowhage“, „cowitch“, „velvet bean“ oder „horse eye nut“. Im deutschsprachigen Raum nennt man sie „Kratzbohne“ oder „Kuhkratze“ [HAGER, 1998, ROTH, 1994, SCHNEIDER, 1974].

Die Kletterpflanze ist weit verbreitet. Sie kommt in den Tropen Asien, Amerika, Afrika und auf den Fiji Inseln – besonders jedoch in Indien vor.

1.2. Botanische Beschreibung

Mucuna pruriens ist eine schlanke, einjährige Kletterpflanze, die im Frühling purpurfarben blüht und – wie eine Wicke – an einem langen, nach unten hängendem Trieb eine samtartige Schote bildet. Die Hülse ist dicht mit bräunlich, die Haut irritierenden Borsten versehen, 7-10cm lang, leicht gewellt (S-förmig) und enthält 4-6 braune, bohnenförmige Samen [DEY, 1980, GOPAL, 1991] (Abbildung 19).



Abbildung 19: Hülse von *Mucuna pruriens*

1.3. Bekannte Inhaltsstoffe

SIDDHURAJU et al. [1996] analysierten die Samen und gaben folgende chemische Zusammensetzung an:

Verbindungen des Primärstoffwechsels	g/kg Trockengewicht
Protein	314,4
Fasern	51,6
Fette	67,3
Asche	41,1
Kohlenhydrate	525,6
Fasern	
neutrale	96,0
saure	213,0
Hemizellulose	117,0
Zellulose	82,0
Lignin	11,2

Mucuna pruriens ist reich an Kalium, Kalzium und Phosphor.

Es wurden 18 verschiedene Aminosäuren und deren Gehalte mit hohen Anteilen an Glutaminsäure, Aspartamsäure, Leucin, Arginin und Lysin bestimmt. Unter den Fettsäuren wurden in den Samen γ -Linolen-, Öl- und Palmitinsäure nachgewiesen, außerdem Stearin-, Linol-, Arachidon- und Behensäure.

Der Gehalt an Blausäure wurde mit 37,5mg/kg Trockengewicht bestimmt. Er reduziert sich beim Autoklavieren oder Trocknen in der Hitze um ca. 70%. Beim Konsum von gekochten Samen besteht daher keine Blausäurevergiftungsgefahr.

Phytinsäure, das „Antiernährungs“eigenschaften aufweist, da es die Bioverfügbarkeit von Mineralen erniedrigt und mit Proteinen Komplexe bildet und somit wichtige Protein-Enzym-Wechselwirkungen verhindert, konnte isoliert werden.

Die Pflanze enthält L-DOPA (L- β -(3,4-Dihydroxy-phenyl)-alanin), dessen Gehalt stark abhängig von der Aufarbeitung der Droge ist. So konnte man in unbehandelten Samen einen Gehalt von 78g/kg TG feststellen, der sich nach dem Trocknen in der Hitze auf 43g/KG TG oder beim Autoklavieren auf 53g/kg TG reduzierte.

1.3.1. Niedermolekulare Inhaltsstoffe

Nach HOPPE et al. [1987] sind Indol-3-Alkylamine, β -Carbolin und Cholin enthalten.

ARUNA et al. [1998] isolierten folgende Verbindungen aus den Wurzeln:

β -Sitosterol, Stigmasterol, β -Amyrinacetat, Ursolsäure, Betulinsäure sowie die Flavone Acacetin und Luteolin.

Aus dem Kraut und den Samen wurden nachstehende Inhaltsstoffe isoliert:

- die Fettsäuren: Laurinsäure, Myristinsäure, Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure, Linolensäure
- Gallussäure, Glutathion, Lecithin, β -Sitosterol, Nicotin und Vernolsäure.

Sowie verschieden Indol-3-alkylamin-Alkaloide:

- Mucunadinin, Mucunadin, Mucunin, Pruriendin, Prurienin, Prurieninin und weitere Alkaloidbasen P, Q, R, S, X [GHOSAL, 1971, PANIKKAR, 1987, SANTRA, 1953].

Aus den Samenschalen wurden Tryptamin, Alkylamine, Steroide, Flavonoide, Cumarine und Cardenolide isoliert [GOPAL, 1991].

Bei einer Recherche auf Naturstoffe im „Dictionary of Natural Products“ [CRC PRESS, 2000] erhält man zusätzlich die folgenden Angaben:

- 5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
- Stizolobinsäure (eine nichtproteinogene Aminosäure, [STEGLICH, 1997])
- 1,2,3,4-Tetrahydro-6,7-dihydroxy-3-isochinolincarbonsäure (S)

1.3.2. Hochmolekulare Inhaltsstoffe

SINGH et al. [1999a, 1999b, 2000] isolierten aus den Samen ein wasserlösliches neutrales Polysaccharid, das sie als Galaktomannan mit einem molaren Verhältnis von D-Galaktose zu D-Mannose von 1:3 identifizierten; ferner wurden Lektine [SIDDHURAJU, 1996] und Proteine mit Molekulargewichten von ca. 23, 26 und 30kD isoliert [MACHUKA, 2000].

Eine Phenoloxidase, die in der Lage war, verschiedene mono-, di- und tricyclische Monophenole in ortho-Position zu hydroxilieren, wurde von PRAS et al. [1990] aus Zellkulturen von *Mucuna pruriens* isoliert. WOERDENBAG et al. [1990] verwendeten diese Phenoloxidase, um aus 3,17- β -Estradiol das 3,4,17- β -Hydroxyestradiol zu gewinnen.

1.4. Volksmedizinische Verwendung

In HOPPE-Drogenkunde [1987] ist die Verwendung der Brennhaare der Fruchthülsen als hautreizendes Mittel beschrieben. Gegen Eingeweidenwürmer wird die Pflanze in der indischen Volksheilkunde eingesetzt [BAL, 1984].

In der traditionellen indischen Ayurveda-Medizin wurden Zubereitungen aus den Samen von *Mucuna pruriens* schon frühzeitig zur Behandlung der Parkinson-Krankheit eingesetzt [HUSSAIN, 1997]. Für die Wirksamkeit ist der hohe Gehalt an L-DOPA verantwortlich zu machen. Außerdem wird es seit Jahrhunderten in der ayurvedischen Medizin als pflanzliches Stärkungsmittel eingesetzt, da es die Fruchtbarkeit bei Mann und Frau fördern soll [GOPAL, 1991].

Aufgrund des hohen L-DOPA-Gehalts wird die Pflanze auch als Allelochemikalie zur Unkrautbekämpfung eingesetzt [FUJII, 1999].

PRUTHI et al. [2000] meldeten ein Patent auf eine Mixtur zur Behandlung von Störungen des Nervensystems einschließlich der Parkinson-Krankheit an. Das Patent umfaßt einen 55-99prozentiger Gewichtsanteil an *Mucuna pruriens* und verschiedenen Gewichtsanteilen von *Piper longum* und *Zingiber officinalis*.

1.5. Pharmakologie

MAHAJANI et al. [1996] untersuchten die Bioverfügbarkeit von L-DOPA aus einem *Mucuna pruriens* Samenpulver, das ca. 4% L-DOPA enthielt. Hierbei konnten sie durch Untersuchungen an Probanden zeigen, daß das L-DOPA aus der *Mucuna*-Rezeptur bioverfügbar ist und nach oraler Gabe schnell aufgenommen wird. Die Plasmaspiegel an L-DOPA aus der *Mucuna*-Rezeptur waren etwas niedriger als nach Gabe von natürlichem reinen L-DOPA ($L\text{-DOPA}_{\text{Mucuna}} = 1,56 \pm 0,163 \mu\text{g/ml}$ bei $t_{\text{max}} = 83 \pm 16,09 \text{min}$ und $L\text{-DOPA}_{\text{rein}} = 2,0 \pm 0,49 \mu\text{g/ml}$ bei $t_{\text{max}} = 60 \text{min}$ [MORRIS, 1976]). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant und die pharmakokinetischen Profile der beiden Testsubstanzen waren sehr ähnlich.

In Rattenmodell konnten HUSSAIN et al. [1997] zeigen, daß die Samen von *Mucuna pruriens* im Vergleich zu äquivalenten Mengen an synthetischem L-DOPA als Mittel gegen die Parkinson-Krankheit doppelt so wirksam waren. Eine Erklärung wäre, daß noch weitere wirksame, bislang unbekannte Verbindungen in der Pflanze enthalten sind oder Komponenten, die synergistisch die Wirkung des vorhandenen L-DOPA potenzieren. *Mucuna pruriens*-Extrakte könnten eine natürliche Protektion auf Gehirn-Neuronen ausüben und gleichzeitig die Bildung neuer Neuronen anregen sowie die Nebenwirkungen minimieren.

RAJENDRAN et al. [1996] konnten zeigen, wie mit Apomorphin vorbehandelte Ratten nach Gabe von *Mucuna pruriens* „beweglicher“ wurden als nach Gabe von reinem L-DOPA; d.h. die Wirksamkeit von Apomorphin wurde durch den Gesamtextrakt stärker antagonisiert als durch L-DOPA alleine.

In einer Studie wurden 60 Parkinson-Patienten mit *Mucuna pruriens* behandelt. Es konnte eine signifikante Erniedrigung des „Hoehn and Unified Parkinson's Disease Rating Scale Scores“ nach 12 Wochen beobachtet werden [MANYAM, 1995].

Insgesamt ähneln sich die Wirkungen des synthetischen L-DOPA im Vergleich zu *Mucuna pruriens*, jedoch scheinen die Wirkmechanismen unterschiedlich zu sein. So tragen die Begleitstoffe in *Mucuna pruriens* deutlich zu einer Steigerung der Antiparkin-

sonaktivität bei und führen im Tiermodell zu einer besseren Toleranz. Die Nebenwirkungen sind geringer als mit reinem L-DOPA und meist nur gastrointestinaler Art.

Mucuna pruriens wurde auch bei anderen Indikationen erfolgreich eingesetzt:

- Eine Samen-Diät führte bei normativen Hasen zu einem hypoglykämischen Effekt, jedoch hatte diese Diät nur einen geringen, nicht statistisch gesicherten Effekt auf Alloxan behandelte Hasen [AKHTAR, 1990].
- Prurienin (eine Alkaloidbase) führte zur Verlangsamung der Herztätigkeit, Erweiterung der Blutgefäße, Blutdrucksenkung und Anregung der Darmperistaltik bei Fröschen. Die Wirkung wird auf eine Histaminfreisetzung zurückgeführt [ROTH, 1994].
- Bei 15 psychiatrischen Patienten konnte eine durch Chlorpromazin verursachte Hyperprolactinämie durch Gabe von 15g des rohen Samenpulvers antagonisiert werden. Die Menge des verabreichten Pulvers entsprach 0,5g L-DOPA. Es traten keinerlei Nebenwirkungen auf [VAIDYA, 1978].

Zellkulturen von *Mucuna pruriens* werden biotechnologisch zur Produktion von L-DOPA verwendet [CHATTOPADHYAY, 1994, PRAS, 1993].

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN DER POLYSACCHARIDE

2.1. Isolierung und Fraktionierung der Rohpolysaccharide

Zur Isolierung der Polysaccharide aus *Mucuna pruriens* Samen wurden 500g des getrockneten und gemahlten Pulvers im Soxhlet nacheinander jeweils für 24h mit Hexan, Dichlormethan und Methanol extrahiert, um lipophile und niedermolekulare Inhaltsstoffe abzutrennen. Der extrahierte Drogerückstand wurde getrocknet und bei 80°C mit demineralisiertem Wasser im Gewichtsverhältnis 1:10 unter Rühren extrahiert, wobei störende Begleitproteine denaturiert werden. Zur Verhinderung eines enzymatischen Abbaus und bakteriellen Befalls gab man nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur 1g Natriumazid zu. Die Suspension wurde zur Abtrennung des Drogenrückstands zentrifugiert und der Überstand 72h gegen demineralisiertes Wasser bei 4°C dialysiert (Ausschlußvolumen 12-14kD). Das Dialysat wurde zentrifugiert und gefriergetrocknet. Dieses Lyophilisat entspricht dem nicht-dialysierbaren, hochmolekularen Anteil des Heißwasserextraktes. Nach erneutem Lösen des Lyophilisats in demineralisiertem Wasser im Verhältnis 1:100 wurden durch Zugabe von Ethanol die Rohpolysaccharide ausgefällt. Dazu gab man tropfenweise das gleiche Volumen Ethanol unter Rühren bei 4°C zu, das Rühren wurde eingestellt und der Niederschlag über Nacht stehen gelassen. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlags, der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung, wurden weitere drei Volumina auf die gleiche Weise zu dem Überstand hinzugegeben und der erhaltene Niederschlag, die Rohpolysaccharid 1+4-Fällung wie oben behandelt.

In Abbildung 20 ist das angewandte Isolierungsschema der Polysaccharide dargestellt.

Die gefriergetrockneten Retentate aus den 1:1 bzw. 1:4 Ethanol-Fällung lieferte die Rohpolysaccharid 1+1- und 1+4-Fällung.

Die Durchführungen der Analysen (DC, Neutralzuckerbestimmung, Anionenaustauschchromatographie, etc.) erfolgten analog den in dem Kapitel über *Phyllanthus amarus* beschriebenen Angaben

Isolierungsschema der Mucuna-Polysaccharide

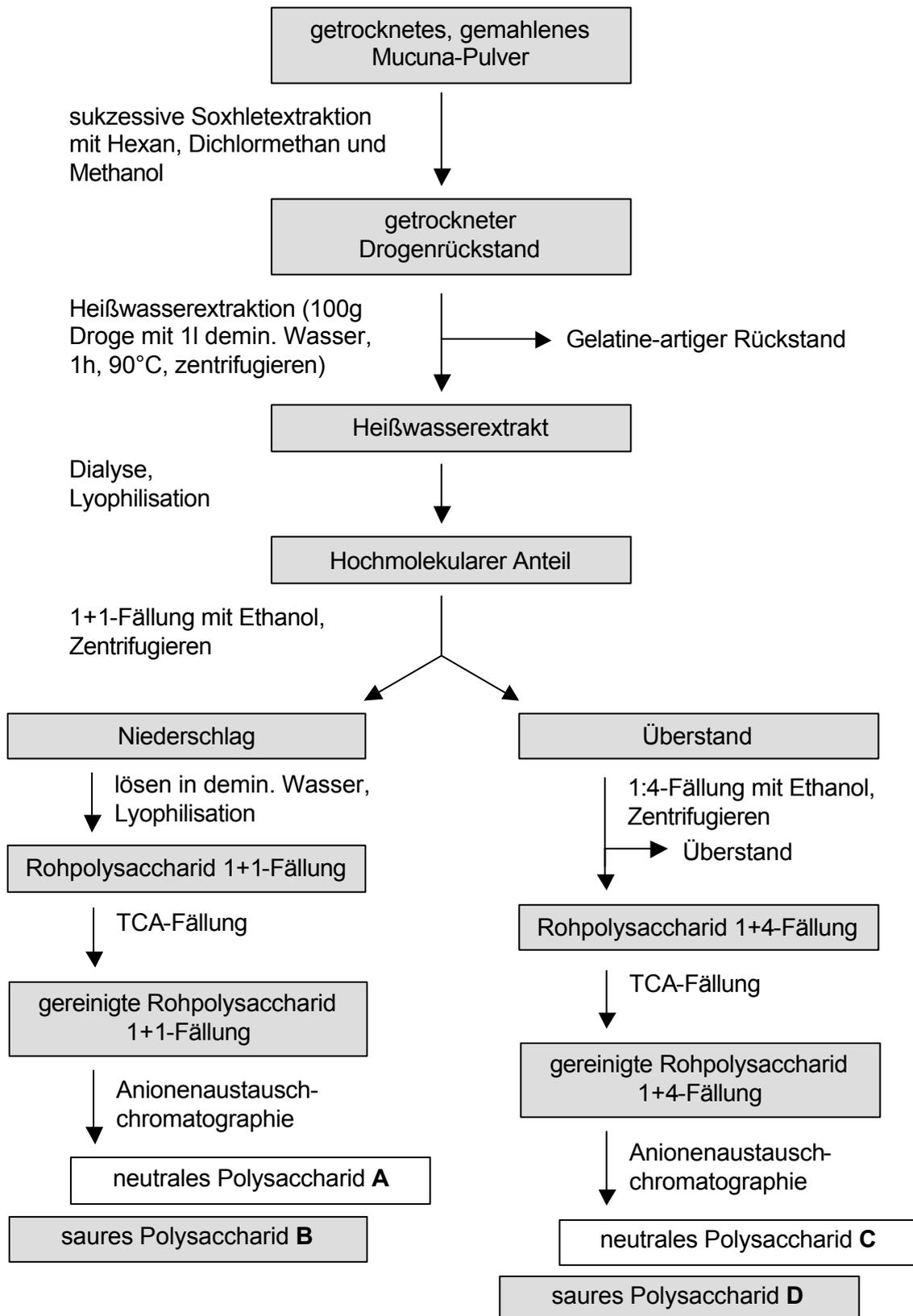


Abbildung 20: Isolierungsschema für die Polysaccharide aus *Mucuna pruriens*

Die Ausbeuten, bezogen auf das Trockengewicht, betragen 11,4g (2,3%) für die Rohpolysaccharid 1+1- und 0,3g (0,1%) für die Ropolysaccharid 1+4-Fällung.

In Tabelle 17 sind die Ausbeuten zusammengestellt.

Fraktion	Menge [g]	
Hexan	27,6	(5,5%)
Dichlormethan	2,4	(0,5%)
Methanol	13,0	(2,6%)
nicht dialysierbarer Anteil	16,7	(3,3%)
Rohpolysaccharid 1+1-Fällung	11,4	(2,3%)
Rohpolysaccharid 1+4-Fällung	0,3	(0,1%)

Tabelle 17: Mengenverhältnisse der unterschiedlichen Fraktionen bei der Extraktion und Ethanol-fällung

Auf eine weitere Untersuchung des gallertartigen Rückstands des Heißwasserextraktes wurde verzichtet, da das Interesse hauptsächlich den aus der Wasserextraktion durch Fällung erhaltenen Polysacchariden galt.

2.2. Allgemeine Charakterisierung der Rohpolysaccharide

Aufgrund geringer prozentualer Ausbeuten der Rohpolysaccharids 1+4-Fällung wurde auf eine Charakterisierung verzichtet und das Interesse auf die Hauptfraktion (Rohpolysaccharid 1+1-Fällung) fokussiert.

2.2.1. Zuckeranalyse

Nach Totalhydrolyse der Rohpolysaccharide mit 2M TFA und anschließender Neutralzuckeranalyse [BLAKENEY, 1983] wurden die Zucker Glucose, Mannose, Arabinose, Galaktose und Xylose nachgewiesen. In Tabelle 18 ist die prozentuale Zusammensetzung des Rohpolysaccharids angegeben.

Zuckermonomer	[%] [*]
Xylose	1,0
Galaktose	1,1
Arabinose	1,4
Mannose	1,7
Glucose	5,3

Tabelle 18: prozentuale Neutralzucker-Zusammensetzung der Zuckermonomere in der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung (* Massenprozent)

2.2.2. Uronsäureanalyse

Durch den Pektinaseabbau und die anschließende DC-Untersuchung konnte die Uronsäure als Galakturonsäure identifiziert werden.

Die quantitative Uronsäurebestimmung erfolgte nach der Methode von BLUMENKRANTZ [1973]. Der Uronsäureanteil der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung betrug 6,7% (Massenprozent).

2.2.3. Proteingehalt

Die Proteinbestimmung nach LOWRY [1951] ergab für die Rohpolysaccharid 1+1-Fällung einen Proteinanteil von 53,9% und für die 1+4-Fällung 30,4%. Der Stickstoffgehalt der 1+1-Fällung lag laut Elementaranalyse (EA) bei 68,1%.

2.2.4. High Performance Gel Permeation Chromatography (HPGPC)

Da das Elutionsprofil Aufschluß über die Reinheit eines Polysaccharid gibt, wurden mittels HPGPC an einer Superose-12-Säule die Rohpolysaccharide und die daraus isolierten Fraktionen aufgetrennt. Über den Brechungsindex (RI) und die UV-Absorptionsmessungen können Homogenität eines Polysaccharids und evtl. Verunreinigungen durch begleitende Proteine (UV-Absorption bei 280nm) überprüft werden.

Die Molekulargewichtsbestimmung von den verschiedenen Polysacchariden im Rohpolysaccharid erfolgte durch Aufstellen einer Eichgerade mit definierten Dextranen und Glucose als Referenzsubstanzen. Durch die erhaltenen Retentionszeiten der HPGPC-Methode wurden die Molekulargewichte bestimmt. In Abbildung 21 sind die Elutionsprofile, dargestellt durch die Brechungsindices und UV-Absorptionen der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung, abgebildet.

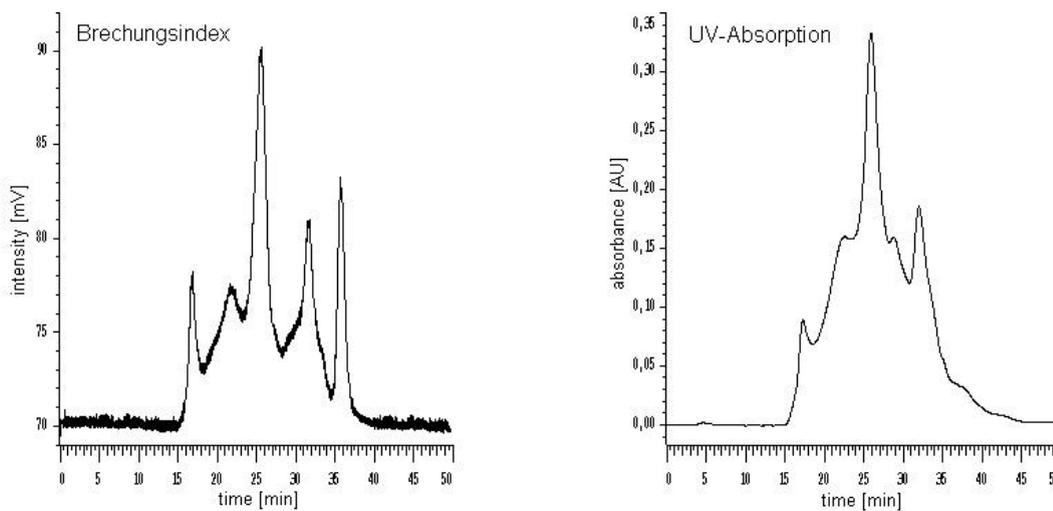


Abbildung 21: HPGPC-Chromatogramm der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung; gemessen mittels Brechungsindex und UV-Absorption (280nm)

Die HPGPC-Chromatogramme zeigen das Vorliegen von Gemischen aus Polysacchariden, Proteinen und Polyphenole in der Rohpolysaccharids 1+1-Fällung an. Im Bereich von 600kD bis 1kD ($R_t = 16-36\text{min}$) lassen sich verschiedene Polymere detektieren. Im UV-Chromatogramm erkennt man, daß noch große Mengen an Verunreinigungen enthalten sind, da reine Zuckerpolymere bei 280nm keine Absorption aufweisen würden.

Wegen des hohe Proteingehaltes der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung war eine Abtrennung mittels TCA erforderlich. Nach der Proteinfällung wurden die Polysaccharide aus dem Überstand erneut mit Ethanol gefällt. Zur Proteinfällung wurden 1,5g der 1+1-Fällung eingesetzt, aber nur 95,8mg (6,4%) aufgereinigtes Polysaccharid erhalten.

2.3. Isolierung und Charakterisierung des Hauptpolysaccharids

2.3.1. Isolierung

Anionenaustauschchromatographie

Bei der Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie konnten aus der gereinigten Rohpolysaccharid 1+1-Fällung ein neutrales Polysaccharid A und ein saures Polysaccharid B isoliert werden. Beide Polysaccharide wiesen einen positiven optischen Drehsinn auf (PS A: $[\alpha] = +31,3^\circ$, PS B: $[\alpha] = +63,0$). In Tabelle 19 sind die erhaltenen prozentualen Mengen angegeben.

eingesetzte Rohpolysaccharid-Fällung	Polysaccharid	Ausbeute [mg]	[%]
1+1 (gereinigt)	A	14,5	7,3
	B	109,7	54,9

Tabelle 19: Ausbeuten der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung nach der Anionenaustauschchromatographie (eingesetzt wurden 500mg)

Da das Polysaccharid B quantitativ die Hauptmenge darstellte, wurde nur dieses weiter bearbeitet.

Das Hauptpolysaccharid B wurde zunächst mittels HPGPC auf Homogenität geprüft. Hierbei konnten noch geringe Mengen an Verunreinigungen detektiert werden, was eine weitere Fraktionierung an Fraktogel[®] nötig machte.

Da aufgrund der erhaltenen HPGPC-Ergebnisse der gereinigten Rohpolysaccharid 1+1-Fällung mit einem Molekulargewicht von ca. 300kD zu rechnen war, wurde an Fraktogel[®] TSK HW-65 (F) getrennt, da dieses den Trennbereich von 10-200kD umfaßt. Nach Chromatographie, Dialyse und Gefriertrocknung wurde eine Ausbeute von 61,3% erhalten.

2.3.2. Charakterisierung

Homogenitätsprüfung und Bestimmung des Molekulargewichts mittels HPGPC

In Abbildung 22 sind die HPGPC-Chromatogramme des Polysaccharids B dargestellt.

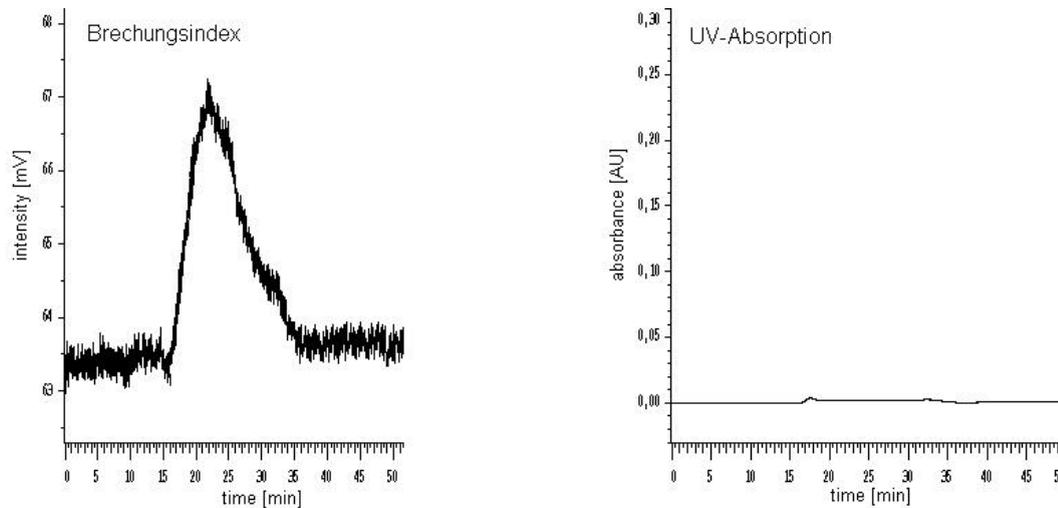


Abbildung 22: HPGPC-Chromatogramme des Hauptpolysaccharids B
($\lambda = 280\text{nm}$)

Das Polysaccharid B zeigt einen homogenen Hauptpeak bei ca. 110kD ($R_t = 22,1\text{min}$). Durch die Aufreinigung ist der Proteinanteil nahezu völlig reduziert worden, wie man an dem UV-Absorptionsspektrum (Abbildung 22, rechts) erkennen kann (vgl. Rohpolysaccharid 1+1-Fällung, Abbildung 21).

Neben der Molekulargewichts- und Proteingehaltsbestimmung [LOWRY, 1951] wurden die spezifische Drehung [nach DAB 10] und der Uronsäuregehalt [BLUMENKRANTZ, 1973] des Hauptpolysaccharids B bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

	Polysaccharid B (Hauptpolysaccharid der 1+1-Fällung)
Proteingehalt [%]	2,3
Uronsäuregehalt [%]	53,0
Spezifische Drehung $[\alpha]_{20^\circ\text{C}}^D$	+63,0
Molekulargewicht [kD]	110

Tabelle 20: Physikalisch-chemische Parameter des *Mucuna*-Polysaccharids

Der Proteinanteil von über 50% im Rohpolysaccharid wurde durch die Aufreinigungsschritte (TCA-Proteinfällung, Anionenaustauschchromatographie und Chromatographie an Fraktogel®) auf 2,3% abgesenkt.

Der Uronsäuregehalt hatte sich durch die Aufreinigung von 6,7% auf 53,0% erhöht. Dies resultierte vermutlich aus der Abtrennung von Proteinen, Neutralzuckern oder hochmolekularen Gerbstoffen.

Bei dem vorliegenden Polysaccharid aus *Mucuna pruriens* handelt es sich demnach um ein saures Polysaccharid mit einem Molekulargewicht von ca. 110kD.

Neutralzuckeranalyse des Polysaccharids B

Nach DC- und GC-Analyse des Polysaccharids konnten die in der Tabelle 21 aufgelisteten Zucker qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Insgesamt weist Polysaccharid B einen Neutralzuckeranteil von 22,5% auf, der sich wie folgt aufgliedert:

Zusammensetzung	[%]
Arabinose	9,9
Galaktose	6,3
Xylose	4,5
Rhamnose	1,8

Tabelle 21: Prozentuale Verhältnisse des genuinen Mucuna-Polysaccharids B

Das Ergebnis war überraschend, da es von der Zusammensetzung der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung deutlich abwich (Glucose 5,3%; Mannose 1,7%; Arabinose 1,4%; Galaktose 1,1%; Xylose 1,0%; siehe Tabelle 18). Der vorher hohe Anteil an Glucose war von 5,3% auf 0% und ebenso der an Mannose von 1,7% auf 0% reduziert worden. Umgekehrt hatten die Anteile an Arabinose von 1,4% auf 9,9% zugenommen, ebenso der Galaktoseanteil von vorher 1,1% auf 6,3% sowie der Xyloseanteil von 1,0% auf 4,5%.

Die starke Reduzierung des Proteinanteils durch die Aufreinigung zusammen mit der Veränderung der prozentualen Zuckerzusammensetzung deutet auf das Vorhandensein verschiedener Glykoproteine hin.

Bestimmung des Veresterungsgrades

In einem sauren Polysaccharid können Carboxyl- oder Hydroxylester vorkommen. Beide Estergruppierungen wurden auf unterschiedliche Weise erfaßt. Der Veresterungsgrad der OH-Gruppen betrug 2,0% und der der Uronsäuren 2,0%, was für das Polysaccharid nur einen geringen Veresterungsgrad ergibt.

Bestimmung des Restwassergehalts

Der Restwassergehalt des Lyophilisats wurde mittels Karl-Fischer-Titration bestimmt und betrug für das Polysaccharid 4,4%.

Neutralzuckeranalyse des Polysaccharids und zweier Derivate

Die Neutralzuckerzusammensetzung des Polysaccharids ist in Tabelle 21 angegeben. Zur weiteren Strukturaufklärung wurde das Polysaccharid partiell mit 0,5M TFA hydrolysiert und mit NaBH₄ (bzw. NaBD₄) reduziert. Von beiden Produkten wurde eine erneute Neutralzuckeranalyse durchgeführt. In der Tabelle 22 sind die Ergebnisse zusammen mit den Werten des genuinen Polysaccharids, der Uronsäure- und Proteinbestimmung aufgelistet.

Zusammensetzung [%]	Polysaccharid		
	genuines PS	part. hydrol. PS	red. PS
Arabinose	9,9	-	9,8
Galaktose	6,3	14,2	37,9
Xylose	4,5	4,6	4,3
Rhamnose	1,8	3,7	1,6
Glucose	-	-	0,6
Galakturonsäure	53,0	46,9	16,3
Proteine	2,3	n.b.	n.b.
Wassergehalt	4,4	n.b.	n.b.

Tabelle 22: Prozentuale Verhältnisse des genuinen und modifizierten Mucuna-Polysaccharids B
n.b. = nicht bestimmt

Im genuinen Polysaccharid B sind die Zucker Rhamnose, Xylose, Galaktose und Arabinose etwa im Verhältnis 1:3:4:6 enthalten. Nach partieller Hydrolyse war in dem resultierenden Produkt keine Arabinose mehr nachweisbar. Die Arabinose muß also ausschließlich in den Seitenketten lokalisiert sein. Die Hauptkette besteht jetzt nur aus Rhamnose, Xylose und Galaktose im Verhältnis ca. 3:4:12. Der Uronsäure- zu Neutralzuckeranteil beträgt etwa 2:1. Das verbleibende Reduktionsprodukt enthält fast ausschließlich Galakturonsäure und nur noch einen geringen Anteil an Glucuronsäure. Der restliche Uronsäureanteil (16,3%) ist auf eine unvollständige Reduktion zurückzuführen.

Aus dem Ergebnis der Neutralzuckeranalyse läßt sich folgern, daß es sich bei Polysaccharid B um ein saures Rhamnoxylogalaktarabinan handelt, dessen „backbone“ überwiegend aus Galakturonsäure, Rhamnose, Xylose und Galaktose aufgebaut ist.

Methylierungsanalysen

Zur Aufklärung der Verknüpfungen der Monomere wurden die folgenden Methylierungsanalysen durchgeführt:

- a) Methylierungsanalyse des genuinen Polysaccharids (vollständige Methylierung, Totalhydrolyse und Acetylierung)
- b) Methylierungsanalyse des partiell hydrolysierten Polysaccharids (vollständige Methylierung, partielle Hydrolyse und Acetylierung)
- c) Methylierungsanalyse des mit NaBD₄ reduzierten Polysaccharids (Reduktion der Uronsäuren, vollständige Methylierung, Totalhydrolyse und Acetylierung)

Zu c): Zur Reduktion wurde NaBD₄ anstelle von NaBH₄ eingesetzt, um den prozentualen Anteil an Uronsäuren und Neutralzuckern zu ermitteln. Dies gelang durch den doppelten Deuterium-Einbau am C-1 Atom, der eine massenspektrometrische Unterscheidung ermöglicht.

Im Anschluß an die jeweilige Methylierungsanalyse wurden die Produkte gaschromatographisch aufgetrennt und anhand der massenspektrometrischen Fragmente den unterschiedlich verknüpften Zuckern bzw. Uronsäuren zugewiesen. Die Zuordnung der einzelnen Zuckerart erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten mit Referenzsubstanzen bzw. mit Literaturwerten [JANSSON, 1976].

Hieraus ergaben sich folgende Werte (siehe Tabelle 23):

Zuckerverknüpfung	Zusammensetzung* des Polysaccharids B [%]		
	genuin	partiell-hydrolysiert	reduziert
term. Rhamnopyranose	-	6,7	-
term. Xylopyranose	-	4,9	-
term. Arabinofuranose	9,8	-	2,6
1,2,5-Arabinopyranose	28,3	-	10,6
1,2,5-Xylopyranose	17,9	19,2	6,2
term. Galaktopyranose	1,7	7,2	1,0
1,2,5-Rhamnopyranose	-	12,5	-
1,2,4,5-Rhamnopyranose	10,3	-	-
1,2,4,5-Arabinofuranose	5,1	-	-
1,4,5-Glucopyranose	-	-	0,8
1,4,5-Galaktopyranose	2,8	6,4	74,2
1,3,4,5-Arabinofuranose	4,9	-	1,5
1,3,5-Galaktopyranose	-	10,8	-
1,5,6-Galaktopyranose	2,5	9,2	-
1,3,5,6-Galaktopyranose	16,7	23,1	2,2

Tabelle 23: Zusammenfassung der Ergebnisse der unterschiedlichen Methylierungsanalysen des Polysaccharids B
* korrigierte Werte nach SWEET [1975]

Die prozentualen Mengenverhältnisse der vorliegenden Zuckermonomere der Methylierungsanalysen passen zu denen der Neutralzuckeranalyse. Da die Reaktions- und Aufreinigungsschritte, insbesondere bei den terminalen Zuckern, zu Verlusten führen können, mußte dies bei der Strukturermittlung berücksichtigt werden [ASPINALL, 1982].

¹³C-Kernresonanzspektroskopie

Da bekanntlich aus Ergebnissen einer Methylierungsanalyse keine Rückschlüsse über die Konfiguration am anomeren C-Atom getroffen werden können, wurde die ¹³C-Spektroskopie zur Bestimmung der jeweiligen axialen oder äquatorialen Stellung der

anomeren C-Atome aufgrund der unterschiedlichen Tieffeldverschiebung herangezogen.

Wegen der schlechten Löslichkeit des Polysaccharids konnte trotz Einsatzes hoher Konzentration und langer Meßzeiten kein ^{13}C -NMR-Spektrum aufgenommen werden.

Aus diesem Grund können Analogieschlüsse nur in Anlehnung an die Literatur gezogen werden [ASPINALL, 1982, 1983, PAULSEN, 2000] (siehe Tabelle 24).

Form	Zucker
b-D	1,2-Xylopyranose
a-L	1,2,4-Rhamnopyranose
a-L-	term. Arabinofuranose
a-L-	1,2-Arabinopyranose
a-L	1,2,5-Arabinofuranose
a-L	1,3,5-Arabinofuranose
b-D-	term. Galaktopyranose
b-D-	1,4-Galaktopyranose
b-D-	1,3-Galaktopyranose
b-D-	1,6-Galaktopyranose
b-D-	1,3,6-Galaktopyranose
a-D-	1,4-Galaktopyranosesäure
a-D	1,4-Glucopyranosesäure

Tabelle 24: Konfigurationszuordnung der Zuckermomere im Polysaccharid B

Zusammenfassung der Ergebnisse

In der Tabelle 25 sind die Ergebnisse der Untersuchungen des Polysaccharids B zusammengefaßt:

Zuckerverknüpfung	Zusammensetzung* des Polysaccharids B [%]		
	genuin	partiell- hydrolysiert	reduziert
term. α -L-Rhamnopyranose	-	6,7	-
term. β -D-Xylopyranose	-	4,9	-
term. α -L-Arabinofuranose	9,8	-	2,6
α -L-1,2-Arabinopyranose	28,3	-	10,6
β -D-1,2-Xylopyranose	17,9	19,2	6,2
term. β -D-Galaktopyranose	1,7	7,2	1,0
α -L-1,2-Rhamnopyranose	-	12,5	-
α -L-1,2,4-Rhamnopyranose	10,3	-	-
α -L-1,2,4-Arabinofuranose	5,1	-	-
β -D-1,4-Glucopyranose	-	-	0,8
β -D-1,4-Galaktopyranose	2,8	6,4	74,2
α -L-1,3,4-Arabinofuranose	4,9	-	2,5
β -D-1,3-Galaktopyranose	-	10,8	-
β -D-1,6-Galaktopyranose	2,5	9,2	-
β -D-1,3,6-Galaktopyranose	16,7	23,1	2,2
Neutralzuckeranteil	22,3	24,6	60,9
Arabinose	9,9	-	9,8
Galaktose	6,3	14,2	37,9
Xylose	4,5	4,6	4,3
Rhamnose	1,8	3,7	1,6
Glucose	-	-	0,6
Uronsäuregehalt [%]	53,0	46,9	16,3
Uronsäureester	2,0	n.b.	n.b.
Ester der OH-Gruppen	2,0	n.b.	n.b.
Proteingehalt [%] nach LOWRY	2,3	n.b.	n.b.
Wassergehalt [%]	4,4	n.b.	n.b.
Spezifische Drehung $[\alpha]_{20^\circ C}^D$	+63,0	n.b.	n.b.
Molekulargewicht-HPGPC [kD]	110	n.b.	n.b.
Molekulargewicht-AF ⁴ [kD]	168	n.b.	n.b.

Tabelle 25: Zusammenfassung der Ergebnisse des Polysaccharids B
n.b. = nicht bestimmt
* korrigierte Werte nach SWEET [1975]

Aus den Untersuchungen des genuinen Polysaccharids B geht hervor, daß es sich bei dem Mucuna-Polysaccharid um ein Pektin handelt, das zu über 50% aus 1,4-verknüpf-ter Galakturonsäure aufgebaut ist. Der Neutralzuckeranteil setzt sich aus den Zuckern Arabinose, Galaktose, Xylose und Rhamnose im Verhältnis ca. 6:4:3:1 zusammen.

Anhand der partiellen Hydrolyse können der Hauptkette des Polysaccharids die Zucker Rhamnose-Xylose-Galaktose etwa im Verhältnis 3:5:22 zugeordnet werden. Die Hauptkette ist stark verzweigt. Es finden sich als Verzweigungen: 1,2-verknüpfte Rhamnose, 1,2-Xylose sowie 1,3-, 1,4-, 1,6- und 1,3,6- Galaktose. Aus der Literatur ist bekannt, daß in verzweigten Galaktoseketten häufig Rhamnosin eingebaut sein können [ASPINALL, 1982]. Aus den Hydrolysergebnissen ist außerdem erkennbar, daß die Abspaltungen hauptsächlich an den Verknüpfungstellen zu den Verzweigungen stattgefunden haben müssen: so liegt im genuinen Polysaccharid bevorzugt die 1,3,6-verknüpfte Galaktopyranose vor, während nach der partiellen Hydrolyse teilweise die 1,3- und 1,6-verknüpfte Galaktoseeinheiten auftraten.

Auffällig ist auch, daß die im genuinen Polysaccharid vorkommende 1,2,4-verknüpfte Rhamnopyranose völlig verschwunden ist und dafür im Partialhydrolysat die 1,2-verknüpfte Rhamnopyranose fast im gleichem Verhältnis erscheint. Dies führt zu dem Schluß, daß die Rhamnopyranose in der Hauptkette 1,2-verknüpfte vorliegt und die Seitenketten in Position 4 angeknüpft sind. Da diese Verzweigungsstelle hydrolysiert wurde, ist es wahrscheinlich, daß an dieser Position eine säurelabile Arabinosekette oder eine terminale Arabinose annektiert ist. So ist Arabinose nicht in der Hauptkette, sondern nur in den Seitenketten vorhanden. Auch Galakturonsäuren müssen in den Seitenketten lokalisiert sein.

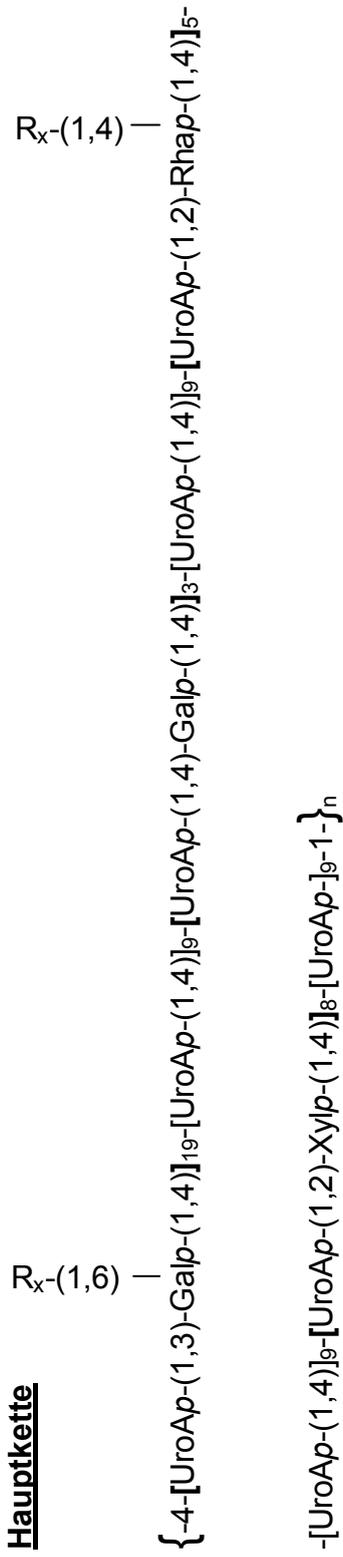
Bei der vorliegenden Hauptkette muß jedoch berücksichtigt werden, daß das Neutralzucker-Zuckersäuren-Verhältnis ca. 1:2 ist, d.h. der Hauptanteil liegt als 1,4-verknüpfte Galakturonsäure vor. Das Polysaccharid muß somit höchstwahrscheinlich aus Bereichen mit längeren sauren Galakturonsäureketten und neutralen Rhamnoxylo-galaktomannanketten aufgebaut sein. Zudem ist noch ein sehr geringer Anteil an 1,4-verknüpfte Glucuronsäure vorhanden. Dieser Anteil beträgt jedoch nur etwa ein Siebzigstel des Anteils an Galakturonsäure.

Die Seitenketten bestehen größtenteils aus hochverzweigten Arabinaneinheiten. Der hohe Verzweigungsgrad wird durch die gefundenen Verknüpfungsstrukturen (1,2-, 1,3,5-, 1,2,5-) bestätigt. Diese sind sowohl furanosidisch wie auch pyranosidisch strukturiert. Weiterhin ist auch ein geringer Anteil an 1,2-verknüpften Xylopyranosen in den Seitenketten vorhanden. Galakturonsäureeinheiten kommen auch in den Seitenketten vor, denn der Galakturonsäureanteil ist nach der partiellen Hydrolyse nicht weiter angestiegen.

Damit kann das *Mucuna*-Polysaccharid dem Strukturtyp II zugeordnet werden (siehe *Phyllanthus amarus*) [ASPINALL, 1983].

Es enthält einen sehr geringen Veresterungsgrad (2,0% der Carboxylgruppen und 2,0% der Hydroxylgruppen).

Unter Berücksichtigung der Zuckerverhältnisse kann folgender Strukturvorschlag für das Hauptpolysaccharid B aus *Mucuna pruriens* gegeben werden (Abbildung 23):



Die Uronsäure (UroAp) liegt im Verhältnis GluAp : GalAp = 1 : 70 vor

Seitenketten

- R₁ = terminale Arabinofuranose
- R₂ = verzweigte Arabinanketten (1,2p-, 1,2,5f- und 1,3,5f-verknüpft)
- R₃ = verzweigte Galaktanketten, z.B. 1,3,6- mit zweifach verknüpften Galp
- R₄ = Arabino-Rhamno-Xylogalaktanketten
- R₅ = Galp-UroAp-Ketten
- R₆ = UroAp-Ketten

Abbildung 23: Strukturvorschlag für das Hauptpolysaccharid B aus *Mucuna pruriens*

Während unserer Arbeiten erschienen Veröffentlichungen von SINGH et al. [1999a, 1999b, 2000], in denen über die Isolierung eines wasserlöslichen neutralen Polysaccharids aus Samen von *Mucuna pruriens* berichtet wurde. Das gereinigte Polysaccharid wurde durch Ethanol-fällungen und Ultrazentrifugation aus Samen gewonnen. Das Polymer enthielt keinen Stickstoff, Schwefel sowie keine Halogene, Acetylgruppen, Uronsäuren oder Methoxygruppen. Nach Hydrolyse mit 72%iger Schwefelsäure bestimmten sie das molare Verhältnis von Galaktose zu Mannose auf 1:3. Durch weitere Hydrolysen konnten sie vier Disaccharide und ein Trisaccharid isolieren:

α -D-Galaktopyranosyl-(1,6)-O- α -D-mannopyranose

β -D-Mannopyranosyl-(1,6)-O- β -D-mannopyranose

β -D-Galaktopyranosyl-(1,4)-O- β -D-mannopyranose

β -D-Mannopyranosyl-(1,4)-O- β -D-mannopyranose

α -D-Galaktopyranosyl-(1,6)-O- α -D-mannopyranosyl-(1,6)-O- β -D-mannopyranose.

Im Rahmen unseren Untersuchungen fanden wir nach Anionenaustauschchromatographie der 1+1-Fällung ebenfalls ein neutrales Polysaccharid. Der prozentuale Anteil im Verhältnis zum sauren Hauptpolysaccharid betrug jedoch nur etwa ein Achtel und wurde deshalb von uns nicht weiter untersucht.

Die Diskrepanz beider Ergebnisse ist vermutlich auf das verwendete Pflanzenmaterial und auf den unterschiedlichen Aufarbeitungsweg zurückzuführen. Denkbar wäre auch, daß bei den eingesetzten Samen-Materialien unterschiedliche Reifegrade vorgelegen hatten.

D PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN VON *CISSUS QUADRANGULARIS* L.

1. ALLGEMEINE ÜBERSICHT

1.1. Systematik und Verbreitung

Botanisch wird *Cissus quadrangularis* L. wie folgt eingeordnet [FROHNE, 1996]:

Abteilung:	Spermatophytae
Unterabteilung:	Magnoliophytinae
Klasse:	Magnoliatae
Unterklasse:	Rosidae
Ordnung:	Rhamnales
Familie:	Vitaceae
Gattung:	Cissus
Art:	quadrangularis

Zur Gattung *Cissus* gehören rund 350 sub-/tropische Kletterpflanzen und sukkulente Arten. Die Art ist weit verbreitet in den Trockengebieten Afrikas (Zentralafrika, Sahel), in denen sie oft kultiviert wird. Die Pflanze bildet riesige Büsche, wobei sie andere Sträucher überwächst.

Im Englischen wird sie als „veldt grape“ und im Deutschen als „kaktusähnlicher Wein“ bezeichnet. Synonyme sind *Cissus cactiformis* oder *Vitis quadrangularis* (L.).

Abbildung 24 zeigt die Pflanze:

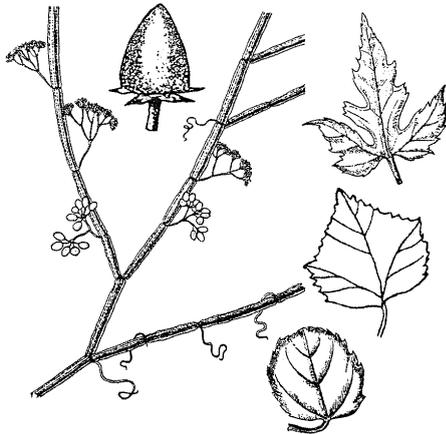


Abbildung 24: *Cissus quadrangularis* (Zweige mit Blüten und Früchten (links), Blätter (rechts))
[NEUWINGER, 1998]

1.2. Botanische Beschreibung

Cissus quadrangularis gehört zu den Kletterpflanzen mit Ranken. Die dünnen Stämme haben gegenständige Blätter und sind robust, sehr sukkulent und scharf vierkantig (selten fünfkantig); die Kanten sind geflügelt, glatt, wachsartig und gestreift. Die 8-10cm langen Internodien sind in der Mitte 12-15mm dick; die Stämme schnüren sich an den Knoten mehr oder weniger zusammen. Die Blätter sind meist 5x10cm, aber auch bis zu 11cm lang und breit; sie sind morphologisch sehr variabel, von fünfwinklig mit 5 Spitzen bis eiförmig-dreieckig, rundlich. Die Basis ist gestutzt oder schwach herzförmig. Die Blätter besitzen eine vorne stumpfe oder spitze Form; sie erscheinen nicht gelappt oder mehr oder weniger tief 3-5fach gelappt. Die Ränder sind grob gezähnt und haben 3-5 Basisnerven und 2-3 weitere Nerven zur Spitze. Der Stiel ist bis zu 4cm lang. Die Pflanze bildet spärliche und kurze weißliche oder grünliche Trugdolden. Die Früchte sind glatte, rundliche oder ellipsoide Beeren, die unreif schwarz und reif rot mit einer Größe bis zu 1,2x0,8cm sind [NEUWINGER, 1998].

1.3. Bekannte Inhaltsstoffe

1.3.1. Niedermolekulare Inhaltsstoffe

Aus *Cissus quadrangularis* wurden bisher verschiedene Terpene, Triterpene, Fette und deren Ester, Vitamine, Säuren, Sterole und Flavone isoliert:

- δ -Amyrin [BUTHANI, 1984]
- δ -Amyron [BUTHANI, 1984]
- Ascorbinsäure [HEGNAUER, 1973]
- 3,21-Dihydroxy-onoceren-7-on [CRC PRESS, 2000]
- Eicosansäureeicosanylester [GUPTA, 1991]
- Eicosanylicosanoat [GUPTA, 1991]
- Friedelan-3-on [GUPTA, 1991]
- 4-Hydroxy-2-methyltricos-2-en-22-on [GUPTA, 1991]
- 7-Hydroxy-20-oxo-docosanylcylohexan [GUPTA, 1991]
- Iso-Pentacosansäure [GUPTA, 1991]
- Kämpferol [ADESANYA, 1999]
- Ketosterin [HEGNAUER, 1973]
- 9-Methyloctadeca-9-en [GUPTA, 1991]
- 31-Methyl-1-tritriacontanol [CRC PRESS, 2000]
- 31-Methyltritriacontan-1-ol [GUPTA, 1991]
- 31-Methyltritriacontansäure [GUPTA, 1991]
- Octadecansäureheptadecylester [GUPTA, 1991]
- 7-Onoceren-3,21-diol ($3\beta,21\alpha$ und $3\alpha,21\beta$) [CRC PRESS, 2000]
- 7-Oxonoceren-8-ene- $3\beta,21\alpha$ -diol [GUPTA, 1990]
- Pallidol [ADESANYA, 1999]
- Parthenocissin A [ADESANYA, 1999]
- Pektine [NEUWINGER, 1998]
- Piceatannol [ADESANYA, 1999]
- Quercetin [ADESANYA, 1999]
- Resveratrol [ADESANYA, 1999]
- β -Sitosterin [HEGNAUER, 1973, NEUWINGER, 1998]
- Taraxerol [GUPTA, 1991]
- Taraxerylacetat [GUPTA, 1991]
- Terpene (drei verschiedene) [BUTHANI, 1984]
- 3,3',4,4'-Tetrahydroxybiphenyl [MEHTA, 2001]
- Weinsäure [HEGNAUER, 1973, NEUWINGER, 1998]

Außerdem die Stilbenderivate:

- Quadrangularin A [ADESANYA, 1999]
- Quadrangularin B [ADESANYA, 1999]
- Quadrangularin C [ADESANYA, 1999]

1.3.2. Hochmolekulare Inhaltsstoffe

Hochmolekulare Inhaltsstoffe wurden bisher aus *Cissus quadrangularis* nicht isoliert.

1.4. **Volksmedizinische Verwendung**

Volkmedizinisch werden folgende Erkrankungen mit der *Cissus quadrangularis* Droge bzw. Zubereitung behandelt:

Wurmerkrankungen, Asthma, Herzrhythmusstörungen, Blutungen, Brustkrebs, Furunkel, gastrointestinale Beschwerden, Gonorrhoe, Hautkrankheiten, Knochenbrüche, Menstruationsbeschwerden, Skorbut, Sterilität, Syphilis und Tuberkulose. Ferner wird es als Abortivum, Brechmittel und zur Geburtserleichterung eingesetzt.

In Indien wird der Saft der frischen, beblätterten Stengel in Milch oder als Paste o.ä. sowohl topisch als auch intern medizinisch verwendet. Seine Anwendung zur Herstellung von Jagd- und Giftmischungen wird ebenfalls beschrieben [CHOPRA, 1956, DEY, 1980, NEUWINGER, 1998].

1.5. **Pharmakologie**

PRASAD et al. [1963, 1970] und UDUPA et al. [1964a, 1964b, 1965] untersuchten den Einfluß von Inhaltsstoffen mit steroidaler Struktur aus *Cissus quadrangularis* auf den Heilungsprozeß von Knochenbrüchen. Sie fanden eine Gewichtszunahme und eine zytologische Veränderung der Schilddrüse und Hirnanhangsdrüse sowie eine Zunahme des Adrenalinpiegels. Sie konnten ferner zeigen, daß der Gesamtextrakt bei der Knochenheilung den anabolischen Effekt von endogenem Kortison neutralisiert. Der stimulierende Effekt des Extraktes war größer als bei dem Hormon Durabolin, wahrscheinlich aufgrund der im Extrakt enthaltenen Phytosteroide und Vitamine. Im Tierversuch wurde die Heilungsdauer durch Extraktgabe um ca. 33% verkürzt. *Cissus quadrangularis* besitzt einen positiven Einfluß auf die organische und mineralische Phase bei der Knochenheilung von Versuchstieren. Den Beweis lieferten die Wissenschaftler

durch den Einbau von radioaktivem Calcium-45-Isotop in die Knochen, die bereits früher stabiler waren als die der unbehandelten Versuchstiere.

SUBBU et al. [1967] fanden ein Glucosid, welches oral und transdermal appliziert keine Wirkungen zeigte, jedoch bei intravenöser Gabe die Versuchstiere sofort tötete (MLD = 15,5mg/kg Körpergewicht Meerschweinchen). Die hierfür verantwortliche Verbindung ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Daß die unbekannte Substanz eine negativ chronotrope Wirkung besitzt, konnten SUBBU et al. zeigen [1970].

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN DER POLYSACCHARIDE

2.1. Isolierung und Fraktionierung des Rohpolysaccharidgemisches

Die Isolierung und Fraktionierung der Polysaccharide aus *Cissus quadrangularis* erfolgte analog der für *Phyllanthus amarus* beschriebenen Methode (siehe Seite 13) und dem Isolierungsschema (Abbildung 3, Seite 14).

Die gefriergetrockneten Retentate lieferten die Rohpolysaccharid 1+1- und 1+4- Fällung aus der 1:1 bzw. 1:4 Ethanol-Fällung.

Die Durchführungen der Analysen (DC, Neutralzuckerbestimmung, Anionenaustauschchromatographie, etc.) erfolgte ebenfalls analog den in dem Kapitel über *Phyllanthus amarus* beschriebenen Angaben.

Die Ausbeuten, bezogen auf das Trockengewicht, betrugen 6,9g (1,3%) für die Rohpolysaccharid 1+1- und 3,3g (0,6%) für Rohpolysaccharid 1+4-Fällung. In Tabelle 26 sind die Ausbeuten zusammengestellt.

Fraktion	Menge [g]	[%]*
Hexan	18,6	3,6
Dichlormethan	5,5	1,1
Methanol	75,4	14,5
nicht dialysierbarer Anteil	14,8	2,8
Rohpolysaccharid 1+1-Fällung	6,9	1,3
Rohpolysaccharid 1+4-Fällung	3,3	0,6

Tabelle 26: Mengenverhältnisse der Fraktionen (*bezogen auf 520,0g Droge)

2.2. Allgemeine Charakterisierung der Rohpolysaccharid-Fällungen

2.2.1. Zuckeranalyse

Bei der DC-Analyse konnten die Zuckermonomere Arabinose, Glucose, Mannose und Galaktose nachgewiesen werden. Die Bestimmung der quantitativen Zuckerzusammensetzung erfolgte nach der Methode von BLAKENEY [1983] (siehe Tabelle 27).

Rohpolysaccharid	Neutralzuckeranteile [%]	
1+1	Arabinose	1,4
	Glucose	1,8
	Mannose	3,0
	Galaktose	5,3
1+4	Arabinose	5,6
	Glucose	8,8
	Mannose	8,8
	Galaktose	16,7

Tabelle 27: prozentuale Neutralzuckerzusammensetzung der Zuckermonomere in den Rohpolysacchariden

2.2.2. Uronsäureanalyse

Durch den Pektinaseabbau und der anschließenden DC-Untersuchung wurde Galakturonsäure nachgewiesen. Die quantitative Uronsäurebestimmung erfolgte nach der Methode BLUMENKRANTZ [1973].

Der Uronsäureanteil der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung betrug 37,2% und der der 1+4-Fällung 11,5%.

2.2.3. Proteingehalt

Bei der Proteinbestimmung nach LOWRY [1951] wurde ein Proteingehalt von 7,3% in der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung und 20,7% in der 1+4-Fällung erhalten.

2.2.4. High Performance Gel Permeation Chromatography (HPGPC)

Zur Ermittlung der Zusammensetzung der Polysaccharid-Fraktion wurden die Rohpolysaccharide mittels HPGPC an einer Superose-12-Säule aufgetrennt. Über den Brechungsindex (RI) und die UV-Absorption (bei 280nm) erhält man Aufschluß über die Homogenität eines Polysaccharids und Hinweise auf Verunreinigungen durch begleitende Proteine.

Die Molekulargewichtsbestimmung der verschiedenen Polysaccharide im Rohpolysaccharid erfolgte durch Aufstellen einer Eichgerade mit definierten Dextranen und Glucose als Referenzsubstanzen. Anhand der Retentionszeiten bei der HPGPC konnte das jeweilige Molekulargewicht bestimmt werden.

In Abbildung 25 sind exemplarisch die Brechungsindices- und UV-Chromatogramme der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung abgebildet.

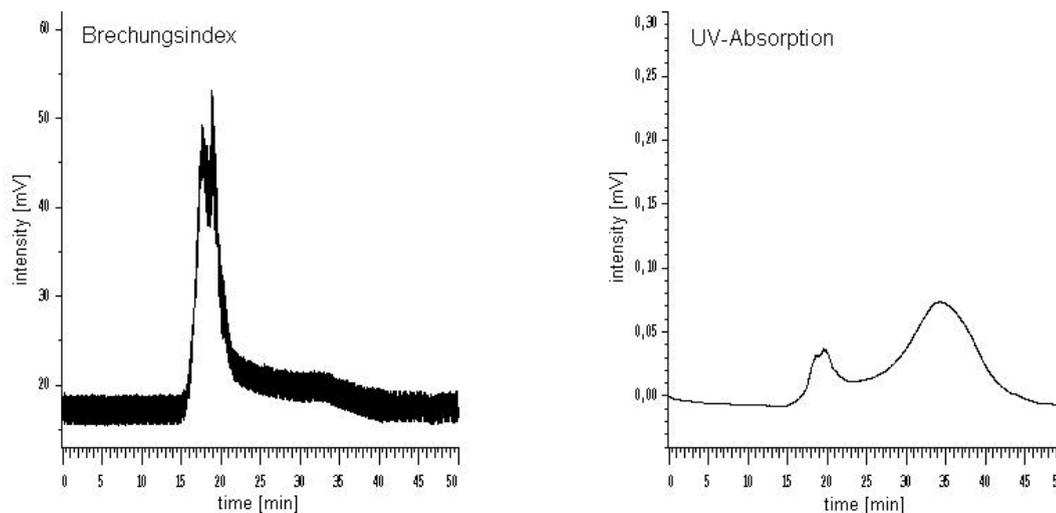


Abbildung 25: HPGPC-Chromatogramme der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung, gemessen mittels Brechungsindex und UV-Absorption (280nm)

Die zu erwartende heterogene Verteilung (verschiedene Polysaccharide, Proteine, Polyphenole) der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung der Droge ist in den HPGPC-Chromatogrammen zu erkennen.

Im Brechungsindex-Chromatogramm sind im Bereich von 100-550kD ($R_t = 17-22\text{min}$) die Polysaccharide und im niedermolekularen Bereich des UV-Chromatogramms ($R_t = 30-40\text{min}$) Verunreinigungen durch Begleitstoffe detektierbar.

2.3. Isolierung und Charakterisierung von Polysaccharid B

2.3.1. Isolierung

Anionenaustauschchromatographie

Bei der Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie konnten aus der Rohpolysaccharid 1+1-Fällung ein neutrales Polysaccharid A und ein saures Polysaccharid B isoliert werden. Beide Polysaccharide weisen einen positiven optischen Drehsinn auf. Bei der Aufreinigung der Rohpolysaccharid 1+4-Fällung wurden gleichfalls ein neutrales Polysaccharid C und ein saures Polysaccharid D mit positivem optischen Drehsinn isoliert. In Tabelle 28 sind die prozentualen Mengen an Polysaccharid, bezogen auf die Fällung, angegeben.

Rohpolysaccharidfällung	Polysaccharid	Ausbeute [mg]	[%]
1+1	A	28,8	5,8
	B	322,5	64,5
1+4	C	29,8	6,0
	D	247,4	49,5

Tabelle 28: Ausbeuten an Polysacchariden aus den Rohfällungen nach Anionenaustauschchromatographie (eingesetzt wurden 500mg)

Aus beiden Rohpolysaccharidfällungen konnte jeweils eine geringe Menge an neutralem Polysaccharid (A bzw. C) und eine größere Menge der sauren Hauptkomponenten B bzw. D isoliert werden. Da es sich bei dem Polysaccharid B um das mengenmäßig vorherrschende Polysaccharid handelte, wurde nur für dieses eine Strukturaufklärung durchgeführt.

2.3.2. Charakterisierung

Homogenitätsprüfung und Bestimmung des Molekulargewichts mittels HPGPC

In Abbildung 26 sind die HPGPC-Chromatogramme des Polysaccharids B dargestellt.

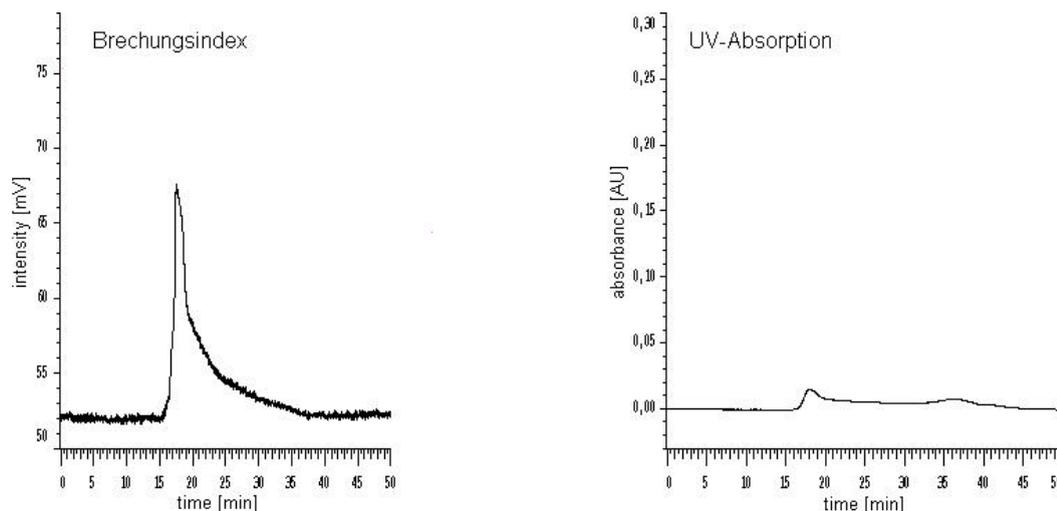


Abbildung 26: HPGPC-Chromatogramme des Hauptpolysaccharids B ($\lambda = 280\text{nm}$)

Das Polysaccharid B zeigt einen Hauptpeak bei ca. 530kD ($R_t = 17,7\text{min}$) und enthält erwartungsgemäß nur noch sehr wenige Proteinverunreinigungen, wie an dem UV-Absorptionsspektrum (Abbildung 26, rechts) erkennbar ist (vgl. Rohpolysaccharid 1+1-Fällung, Abbildung 25).

Eine weitere Aufreinigung an Fraktogel[®] wurde im kleinen Maßstab durchgeführt. Da sich die Zusammensetzung nur wenig verändert hatte, wurde mit dem Polysaccharid B weitergearbeitet.

Proteingehalt, spezifische Drehung und Uronsäuregehalt

Neben dem Molekulargewicht und dem Proteingehalt [LOWRY, 1951] wurden die spezifische Drehung [nach DAB 10] und der Uronsäuregehalt [BLUMENKRANTZ, 1973] des Hauptpolysaccharids B bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 zusammengefaßt.

	Polysaccharid B (Hauptpolysaccharid der 1+1 Rohfällung)
Proteingehalt nach LOWRY [%]	2,8
Uronsäuregehalt [%]	43,3
Spezifische Drehung [α] _{20°C} ^D	+59,0
Molekulargewicht [kD]	530

Tabelle 29: Physikalisch-chemische Parameter des Cissus-Polysaccharids B

Der Proteinanteil wurde von 7,3% im Rohpolysaccharid auf 2,8% reduziert. Dieses Ergebnis war aufgrund des UV-Spektrums bei der HPGPC-Charakterisierung zu erwarten, da der Anteil der im UV-Bereich absorbierenden deutlich abgenommen hatte.

Der Uronsäuregehalt hatte sich durch die Aufreinigung etwas erhöht (von 37,2% auf 43,3%). Es handelt sich also um ein saures Polysaccharid, das mit einem ermittelten Molekulargewicht von 530kD überraschend groß ist.

Neutralzuckeranalyse

Nach DC- und GC-Analyse des Polysaccharids konnten die Zucker qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Insgesamt weist das Polysaccharid einen Neutralzuckeranteil von 22,3% auf, der sich wie folgt in die Zuckermonomere aufgliedert (siehe Tabelle 30):

Zusammensetzung	[%]*
Xylose	1,4
Arabinose	2,9
Mannose	6,2
Galaktose	11,8

Tabelle 30: Prozentuale Verhältnisse des genuinen Polysaccharids B bezogen auf das gesamte Polysaccharid

Die Zuckerzusammensetzung hatte sich im Vergleich zu dem Rohpolysaccharid (Arabinose 1,4%, Glukose 1,8%, Mannose 3,0%, Galaktose 5,3%) verändert. Der Galaktose-, Mannose- und Arabinoseanteil hat sich erhöht. Glucose ist im Polysaccharid B nicht vorhanden, dafür findet sich Xylose zu einem geringen Prozentsatz.

Bestimmung des Veresterungsgrades und des Wassergehalts

Die Bestimmung erfolgte nach SCHÖLLHORN [1994] und ergab nur eine 0,2%ige Veresterung der Hydroxylgruppen und eine 0,9%ige Veresterung der Carboxylgruppen des Polysaccharids.

Der Restwassergehalt des Polysaccharids B betrug 9,4% (Methode: Karl-Fischer-Titration).

Neutralzuckeranalyse des Polysaccharids und zweier Derivate

Die Neutralzuckerzusammensetzung des Polysaccharids ist in Tabelle 30 angegeben. Zur weiteren Strukturaufklärung wurde das Polysaccharid partiell hydrolysiert und reduziert. Von beiden Produkten wurde eine Neutralzuckeranalyse durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 31 angegeben sind. Zum Vergleich sind die Werte des genuinen Polysaccharids und die Ergebnisse der Uronsäurebestimmung mitangegeben.

Zusammensetzung [%]	Polysaccharid		
	genuines PS	part. hydrol. PS	red. PS
Galaktose	11,8	11,1	44,7
Mannose	6,2	12,5	12,1
Arabinose	2,9	-	4,5
Xylose	1,4	1,0	2,4
Glucose	-	-	6,2
Uronsäure	43,3	54,9	15,1
Proteine	2,8	n.b.	n.b.
Wassergehalt	9,4	n.b.	n.b.

Tabelle 31: Prozentuale Verhältnisse des genuinen und modifizierten Cissus-Polysaccharids B
n.b. = nicht bestimmt

Demnach sind im genuinen Polysaccharid die Zucker Xylose, Arabinose, Mannose und Galaktose etwa im Verhältnis 1:2:4:8 enthalten. Nach partieller Hydrolyse und der damit verbundenen Abspaltung der Seitenketten lag das Verhältnis Mannose zu Galaktose nun bei 1:1. Aus diesem Grund muß der Hauptstrang des Polysaccharids aus einer alternierenden Mannose-Galaktose-Zuckerkette aufgebaut sein. Zusätzlich ist noch ein geringer Teil an Xylose vorhanden.

Nach Reduktion des Polysaccharids hat sich erwartungsgemäß der Neutralzuckeranteil stark erhöht und der Uronsäureanteil erniedrigt. Der restliche Uronsäureanteil (15,1%) deutet auf eine unvollständige Reduktion hin. Wie aus der DC-Analyse bereits erkennbar, handelt es sich bei der nachgewiesenen Uronsäure um Galakturonsäure. Zusätzlich konnte durch die GC-Analyse noch ein Anteil an Glucose detektiert werden, der auf das Vorhandensein von Glucuronsäure hinweist. Diese war nach Pektinasehydrolyse und DC-Analyse nicht nachweisbar.

Methylierungsanalysen

Zur Aufklärung der Verknüpfungen der Monomere wurden die folgenden Methylierungsanalysen durchgeführt:

- Methylierungsanalyse des genuinen Polysaccharids (vollständige Methylierung, Totalhydrolyse und Acetylierung)
- Methylierungsanalyse des partiell hydrolysierten Polysaccharids (vollständige Methylierung, partielle Hydrolyse und Acetylierung)
- Methylierungsanalyse des mit NaBD₄ reduzierten Polysaccharids (Reduktion der Uronsäuren, vollständige Methylierung, Totalhydrolyse und Acetylierung)

Zu c): Zur Reduktion wurde NaBD₄ eingesetzt und anschließend die jeweilige Methylierungsanalyse (analog zu *Phyllanthus amarus*) durchgeführt. Hieraus ergaben sich für die Zuckerverknüpfungen folgende Ergebnisse (Tabelle 32):

Zuckerverknüpfung	Zusammensetzung* des Polysaccharids B [%]		
	genuin	partiell-hydrolysiert	reduziert
term. Xylopyranose	3,7	0,8	4,3
term. Arabinofuranose	2,0	0,4	-
1,5-Arabinofuranose	2,0	-	-
1,2,5-Arabinofuranose	5,7	0,4	8,0
1,3-Mannopyranose	4,5	10,1	5,7
1,6-Mannopyranose	8,9	15,4	8,0
1,2,3-Mannopyranose	4,5	20,6	3,0
term. Galaktopyranose	1,2	2,6	3,2
1,4-Galaktopyranose	14,7	8,3	42,7
1,3,6-Galaktopyranose	49,0	27,7	14,1
1,3,4,6-Galaktopyranose	3,8	13,7	3,7
1,4-Glucopyranose	-	-	7,3

Tabelle 32: Zusammenfassung der Ergebnisse der unterschiedlichen Methylierungsanalysen des Polysaccharids B

* korrigierte Werte nach SWEET [1975]

Die Verhältniszahlen der Zuckermonomere der Methylierungsanalysen passen zu denen der Neutralzuckeranalyse, wenn man berücksichtigt, daß die Reaktions- und Aufreinigungsschritte, insbesondere bei den terminalen Zuckern, zu Verlusten führen können [ASPINALL, 1982].

Die partielle Hydrolyse zeigte, daß die Hauptkette des Polysaccharids aus Mannose- und Galaktose-Einheiten aufgebaut ist. Die Kette weist Verzweigungen auf, wie aus dem hohen Prozentanteil verschieden verknüpfter Zuckermonomere (Mannose: 1,2,3- und 1,6-; Galaktose: 1,3,6- und 1,3,4,6-verknüpft) hervorgeht. Aus der Literatur [BUCKERIDGE, 1995, GUPTA, 1990, IKUTA, 1997, MESTECHKINA, 1998] sind Galaktomannane bekannt, die eine Hauptkette aus Mannosen mit unterschiedlich verknüpften Galaktosen bilden. Die Hauptkette enthält außerdem 1,4-verknüpfte Glucuronsäure und Galakturonsäuren im Verhältnis 1:4. Die Neutralzucker kommen im Verhältnis 1:2 zu den Uronsäuren vor.

Daher ist anzunehmen, daß es Bereiche mit längeren sauren Galakturonketten neben den neutralen Galaktomannanketten gibt, dies z.T. auch alternierend. Da nach den Analysen der prozentuale Mannoseanteil im Partialhydrolysat zunimmt, dürften sich Mannosemonomere nahezu ausschließlich in der Hauptkette finden.

Der Arabinoseanteil nimmt dagegen (abgesehen von den 1,2,5-verzweigten Einheiten) nach der partiellen Hydrolyse genau wie der Gehalt an terminaler Xylose stark ab. Arabinosen und Xylosen finden sich also vor allem in den Seitenketten.

¹³C-Kernresonanzspektroskopie

Im ¹³C-Spektrum können die anomeren C-Atome aufgrund der unterschiedlichen Tieffeldverschiebung durch Vergleich mit Literaturwerten der jeweiligen axialen oder äquatorialen Stellung zugeordnet werden.

Durch Vergleich mit Literaturdaten konnten die Signale den verschiedenen Zuckern mit ihren Verknüpfungen zugeordnet werden (siehe Tabelle 33):

Zuckerverknüpfung	Verschiebungen [ppm]	Literaturwerte [ppm]	Literatur
1,4- α -D-GalpA C6 1,4- α -D-GlupA C6	174,9	174,1 174,5-176,8 174,9	KEENAN, 1985 DAVIS, 1990 MORI, 1981
term. β -D-Galp C1 1,3,6- β -D-Galp C1	105,1	105,1 105,2 105,1	COLLINS, 1981 CAPEK, 2000 KANARI, 1989
1,3- β -D-Manp C1 1,4- α -D-GlupA C1	103,1	103,0 103,3	GRASDALEN, 1980 MORI, 1981
1,4- α -D-GalpA C1	102,1	102,5	SUN, 1987
term. α -D-GalpA C1	100,4	100,5 100,3	SHIMIZU, 1989 MORI, 1981
term.- α -D-Xylp C1	99,4	100,0	McEWAN, 1982
1,2,5- α -L-Araf C2	87,9	88,2	CAPEK, 1983
term. α -L-Araf C2 1,5- α -L-Araf C4	83,1	82,5 83,4	CAPEK, 1983 CAPEK, 1983
1,4- β -D-Galp C5 1,6- β -D-Manp C5 1,2,3- α -D-Manp C3	76,9	76,6	DAVIS, 1990 GANTER, 1995 IKUTA, 1997
1,4- β -D-Galp C4 1,6- β -D-Manp C2 1,2,3- α -D-Manp C5 1,3- β -D-Manp C3	74,2	74,2 74,4 74,2 74,4	RYDEN, 1989 GANTER, 1995 IKUTA, 1997 GRASDALEN, 1980
1,4- α -GalAp C3	71,1	70,8	DAVIS, 1990
term. α -D-Xylp C4	70,4	69,9	McEWAN, 1982
term. β -D-Galp C4	69,4	69,3 69,6	COLLINS, 1981 RYDEN, 1989
term.- α -L-Araf C6 1,2,3- α -D-Manp C4	66,1	65,9 66,3	GROMAN, 1994 IKUTA, 1997
1,3- β -D-Manp C6	63,0	63,6	GRASDALEN, 1980
term. α -L-Araf C5 1,4- β -D-Galp C6 1,6- β -D-Manp C6	62,1	62,3 62,2 62,5	SAULNIER, 1988 DAVIS, 1990 GANTER, 1995
term. β -D-Galp C6 term. α -D-Xylp C5 1,2,3- α -D-Manp C6	61,5	61,9 61,6 61,9	RYDEN, 1989 McEWAN, 1982 IKUTA, 1997
-OCH ₃ an C4	60,5	60,6	DINAND, 2001

Tabelle 33: Resonanzen der C-Atome für das Polysaccharid B im Vergleich zu Literaturwerten

Aufgrund der hochkomplexen Struktur, der hohen Molekülgröße, des hohen Galakturonsäureanteils und der eingeschränkten Löslichkeit war es nicht in allen Fällen möglich, die sich stark überlagernden Signale zuzuordnen (siehe Tabelle 33). Anhand der

NMR-Daten und dem Vergleich mit Literaturdaten konnte jedoch größtenteils geklärt werden, in welcher Konfiguration die bereits zugeordneten Zucker vorliegen (Tabelle 34):

Form	Zucker
a-D-	term. Xylopyranose
a-L-	term. Arabinofuranose
a-L-	1,5-Arabinofuranose
a-L-	1,2,5-Arabinofuranose
b-D-	1,3-Mannopyranose
b-D-	1,6-Mannopyranose
b-D	1,2,3-Mannopyranose
b-D-	term. Galaktopyranose
b-D-	1,4-Galaktopyranose
b-D-	1,3,6-Galaktopyranose
b-D-	1,3,4,6-Galaktopyranose
a-D-	1,4-Galaktopyranosesäure
a-D	1,4-Glucopyranosesäure

Tabelle 34: Konfigurationszuordnung der Zuckermonomere im Polysaccharid B

Mannose und Galaktose liegen in der β -D-, Arabinose in der α -L- und Xylose in der α -D-Form vor.

Für die 1,3,4,6-Galaktopyranose liegen keine Literaturwerte vor, jedoch dürfte aus Analogiegründen die β -D-Form sehr wahrscheinlich sein. Die entsprechenden Signale sind im ^{13}C -NMR-Spektrum überlagert und daher nicht anzugeben.

Die Werte der 1,2,3-verknüpften Mannopyranose entsprechen annähernd denen der α -D-Form, doch konnte das Signal des anomeren C-Atoms nicht zugeordnet werden (1,2,3- α -D-Manp C-1 = 101,6ppm [IKUTA, 1997]). Aus diesem Grund liegt wahrscheinlich die 1,2,3-verknüpfte Mannopyranose - so wie die 1,3- und 1,6-verknüpfte Mannopyranose - in der β -Form vor. Die ^{13}C -NMR-Daten von IKUTA et al. [1997] stammen aus Untersuchungen des Pilzes *Trichophyton mentagrophytes*. Aus der Literatur

[ASPINALL 1982, 1983] ist aber bekannt, daß in Polysacchariden von Pilzen meist andere Verknüpfungarten und Konfigurationen vorkommen.

Die Galakturon- und Glucuronsäure weisen die α -D-Form auf. Die Signale der veresterten Galakturonsäure mit deren Methylester im ^{13}C -Spektrum erscheinen bei 174,9ppm.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Polysaccharids B

In der Tabelle 35 sind die Untersuchungsergebnisse des Polysaccharids B zusammengefaßt:

Zuckerverknüpfung	Zusammensetzung* des Polysaccharids B [%]		
	genuin	partiell-hydrolysiert	reduziert
term. α -L-Xylopyranose	3,7	0,8	4,3
term. α -L-Arabinofuranose	2,0	0,4	-
α -L-1,5-Arabinofuranose	2,0	-	-
α -L-1,2,5-Arabinofuranose	5,7	0,4	8,0
β -D-1,3-Mannopyranose	4,5	10,1	5,7
β -D-1,6-Mannopyranose	8,9	15,4	8,0
β -D-1,2,3-Mannopyranose	4,5	20,6	3,0
term. β -D-Galaktopyranose	1,2	2,6	3,2
β -D-1,4-Galaktopyranose	14,7	8,3	42,7
β -D-1,3,6-Galaktopyranose	49,0	27,7	14,1
β -D-1,3,4,6-Galaktopyranose	3,8	13,7	3,7
α -D-1,4-Glucopyranose	-	-	7,3
Neutralzuckeranteil	22,3	24,6	60,9
Galaktose	11,8	11,1	31,7
Mannose	6,2	12,5	13,4
Arabinose	2,9	-	4,9
Xylose	1,4	1,0	3,0
Glucose	-	-	7,9
Uronsäuregehalt [%]	43,3	54,9	15,1
Uronsäureester	0,9	n.b.	n.b.
Ester der OH-Gruppen	0,2	n.b.	n.b.
Proteingehalt [%] nach LOWRY	2,8	n.b.	n.b.
Wassergehalt [%]	9,4	n.b.	n.b.
Spezifische Drehung $[\alpha]_{20^\circ C}^D$	+59,0	n.b.	n.b.
Molekulargewicht-HPGPC [kD]	530	n.b.	n.b.
Molekulargewicht-AF ⁴ [kD]	272	n.b.	n.b.

Tabelle 35: Zusammenfassung der Ergebnisse des Polysaccharids B

n.b. = nicht bestimmt

* korrigierte Werte nach SWEET [1975]

Bei dem vorliegenden genuinen Polysaccharid handelt es sich um ein zu 43,3% aus Galakturonsäure aufgebautes Pektin. Der Anteil der Neutralzucker setzt sich aus Xylose, Arabinose, Mannose und Galaktose und im Verhältnis 1:2:4:8 zusammen und gehört zur Klasse der sauren Xyloarabinomannogalaktane.

Durch die partielle Hydrolyse werden vor allem Arabinose und Xylose abgespalten. Die zurückbleibende Hauptkette besteht zu etwa gleichen Teilen aus Galaktose und Mannose. Die Hauptkette ist wegen des hohen Anteils an verzweigten Zuckereinheiten sehr komplex aufgebaut (Mannose: 1,2,3- und 1,6-; Galaktose: 1,3,6- und 1,3,4,6-verknüpft). In der Literatur sind Galaktomannane bekannt, die eine Hauptkette aus Mannose mit unterschiedlichen Verzweigungsstellen aufweisen und zusätzlich Galaktoseanknüpfungen besitzen [ASPINALL, 1982, 1983].

Bei der vorliegenden Hauptkette muss jedoch berücksichtigt werden, daß das Zucker-Zuckersäuren-Verhältnis ca. 1:2 beträgt. Es liegt somit ein saures Polysaccharid vor, dessen saurer Anteil zu etwa vier Teilen aus 1,4-verknüpften Galakturonsäuren und zu einem Teil aus 1,4-verknüpften Glucuronsäuren aufgebaut ist. Deshalb liegen wahrscheinlich Bereiche mit längeren sauren Galakturonketten neben den neutralen Galaktomannanketten vor.

Aus den Analysen ist ersichtlich, daß der Anteil an Mannose in der Hauptkette zunimmt und somit die Mannosemonomeren in der Hauptkette zu finden sind, während die Anteile an Arabinose und Xylose durch die partielle Hydrolyse stark abnehmen. Dies zeigt, daß die beiden Pentosen in den Seitenketten des Polysaccharids enthalten sein müssen.

Die prozentuale Abnahme an 1,3,6- und 1,4-verknüpften Galaktopyranosen im Partialhydrolysat gegenüber dem genuinen Polysaccharid läßt darauf schließen, daß diese beiden Galaktopyranoseeinheiten sowohl in der Hauptkette wie auch in den Seitenketten gebunden vorliegen. In den Seitenketten kommen die 1,4- und 1,3,6-verknüpften Galaktopyranosen in einem Verhältnis von etwa 1:3 vor.

Aufgrund der komplexen Struktur kann das Polysaccharid dem Strukturtyp II zugeordnet werden (siehe *Phyllanthus amarus*) [ASPINALL, 1983].

Damit kann folgender Strukturvorschlag für das Hauptpolysaccharid B aus *Cissus quadrangularis* gemacht werden (Abbildung 27):

E ASYMMETRISCHE FLUß-FELDflußFRAKTIONIERUNG (AF⁴)

Die asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung (AF⁴) ist eine Trenntechnik zur Bestimmung von Größenverteilungen in Partikel-, Protein- oder Polymerproben [LIU, 1993]. Ihr Einsatzbereich reicht bei Partikeln von ca. 1nm bis 100µm und bei Makromolekülen von 10³ bis 10¹²D. Die Vorteile der AF⁴ sind der geringe Aufwand der Probenpräparation, die schonenden Trennbedingungen und die Möglichkeit, verdünnte Proben im Trennkanal aufzukonzentrieren.

Durch Kalibration mit geeigneten Referenzsubstanzen kann die Anlage sowohl zur Größen- und Molekulargewichtsverteilung als auch zur Quantifizierung eingesetzt werden. In der Literatur sind erfolgreiche Arbeiten zur Molekulargewichtsbestimmung von Biopolymeren mittels AF⁴ (bzw. FFFF) beschrieben [KULICKE, 1999, ROESSNER, 1994, WHITE, 1997], jedoch beschränkten sich die Untersuchungen meist auf die leicht zugänglichen käuflichen Standardsubstanzen wie z.B. Dextran, Pullulan, Stärke oder Zellulose.

1. TRENNPRINZIP

Das Trennprinzip der AF⁴ ist in Abbildung 28 dargestellt.

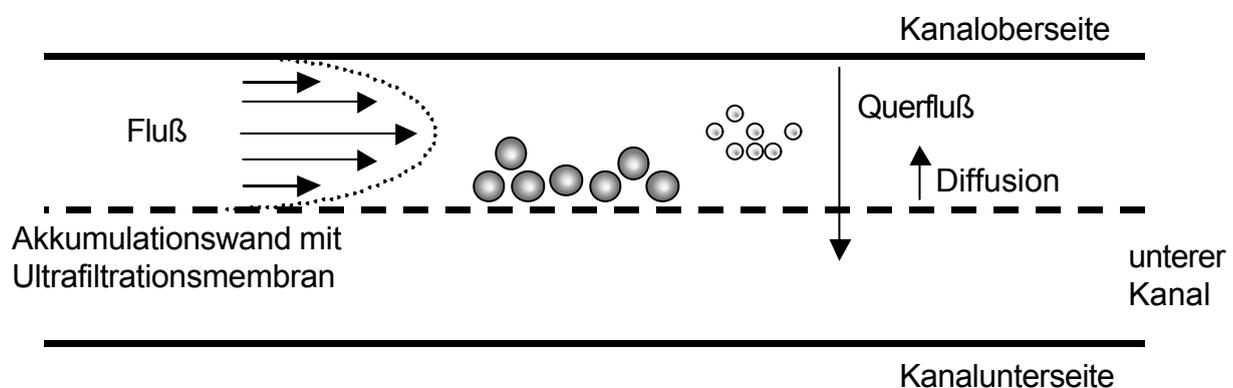


Abbildung 28: Trennprinzip der asymmetrischen Fluß-Feldflußfraktionierung (AF⁴)

Im Kanal bildet sich zwischen der Kanaloberseite und der Akkumulationswand ein parabelförmiges laminares Strömungsprofil aus. Senkrecht zum Fluß wird ein Querfluß erzeugt, welcher für die Trennkraft verantwortlich ist. Die Gegenkraft zum Querfluß bildet die Rückdiffusion in den Kanal. Jede Probe nimmt im Kanal (in Abhängigkeit vom hydrodynamischen Volumen) eine definierte Gleichgewichtsposition durch den spezifischen Diffusionskoeffizienten ein.

Der Querfluß bewirkt nach Probenaufgabe zunächst eine Probenanreicherung in Richtung der Akkumulationswand. Die Gleichgewichtsposition ist von der Probengröße, der Polarität der Ultrafiltrationsmembran und der Probe, dem Fluß und dem Querfluß abhängig. Je näher die Gleichgewichtsposition an der Akkumulationswand liegt, umso später wird die Probe eluiert, d.h. größere Partikel oder Probenmoleküle werden durch den Querfluß stärker an die Akkumulationswand „gedrückt“ als kleinere, wodurch die Gleichgewichtsposition näher an der Akkumulationswand liegt. Große Probenmoleküle eluieren später, da die Strömungsgeschwindigkeit parabelförmig entgegen der Entfernung zur Akkumulationswand abnimmt.

Der Querfluß wird nicht durch Abzweigen eines Teils des Laminarflusses erzeugt, sondern wird von einer zusätzlichen Pumpe in den oberen Kanal gepumpt und im unteren Kanal abgezogen. Hierdurch wird der Laminarfluß konstant gehalten.

2. VERSUCHSAUFBAU

Der Versuchsaufbau der AF⁴ ist in Abbildung 29 dargestellt.

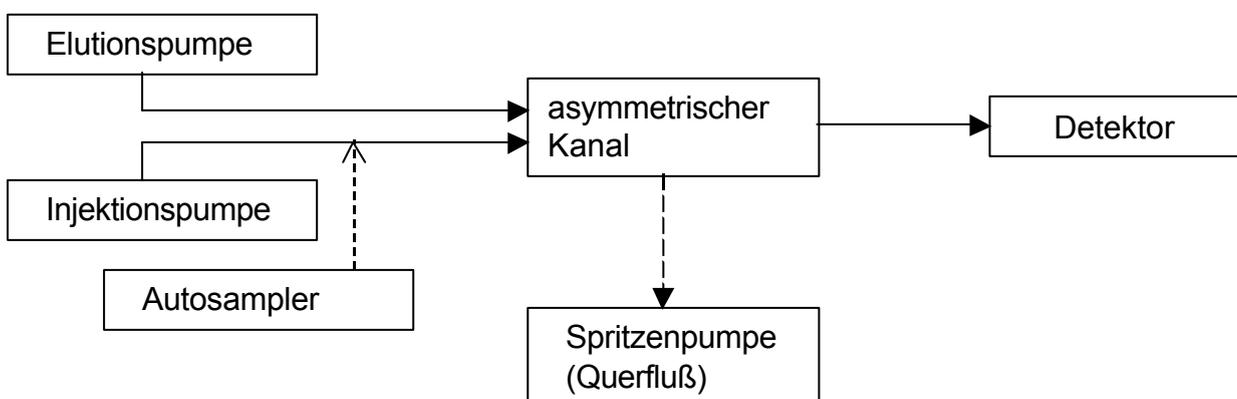


Abbildung 29: schematischer Versuchsaufbau der AF⁴ (ohne Umschaltventile)

Eine Elutionspumpe fördert die Elutionsflüssigkeit ventilgesteuert in den Trennkanal (Laminarfluß). Mit einer Injektionspumpe wird die Probe manuell oder automatisch (Autosampler) mittels eines Injektionsventils über einen separaten Einlaß in den Kanal injiziert. Die Probe wird durch den Querfluß der saugend eingesetzten Spritzenpumpe und dem ventilgesteuerten Laminarzufluß (Fokussierfluß) auf der Membran fokussiert. Dieser Schritt kann zeitlich verlängert werden, um stark verdünnte Proben anzureichern. Über computergesteuerte Ventilsysteme und Pumpen werden die zur optimalen Trennung benötigten Flüsse eingestellt. Nach der Fraktionierung im Trennkanal erfolgt die Registrierung mit einem Durchflußdetektor.

3. MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG VON POLYSACCHARIDEN MITTELS AF⁴- UND RI-DETEKTOR

Um die Molekülgröße bestimmen zu können, wurde als erstes das AF⁴-System mit geeigneten Standards geeicht. Derzeit verwendet man Dextrane und Pullulane, da diese in definierten Größen zugänglich sind. Hierbei handelt es sich um eine relative Molekülmassenbestimmung.

Da Polysaccharide keine Absorption im UV-Licht aufweisen, wurden die Proben mittels RI-Detektor nachgewiesen.

In Vorversuchen mit den Standardeinstellungen der AF⁴ konnte mit den Dextranstandards kein befriedigendes Ergebnis erhalten werden, da die molekulare Verteilung der Dextrane sehr groß ist und die Nachweisempfindlichkeit des RI-Detektors nicht ausreichend war. Aus diesem Grund wurden die Fokussierzeit verlängert, die Querflußrate erhöht und verschiedene Membrane auf ihre Brauchbarkeit geprüft. Zudem wurde der übliche Phosphatpuffer durch Wasser ersetzt. Mit diesen Modifikationen konnte schließlich ein befriedigendes Ergebnis erzielt werden (siehe Abbildung 30).

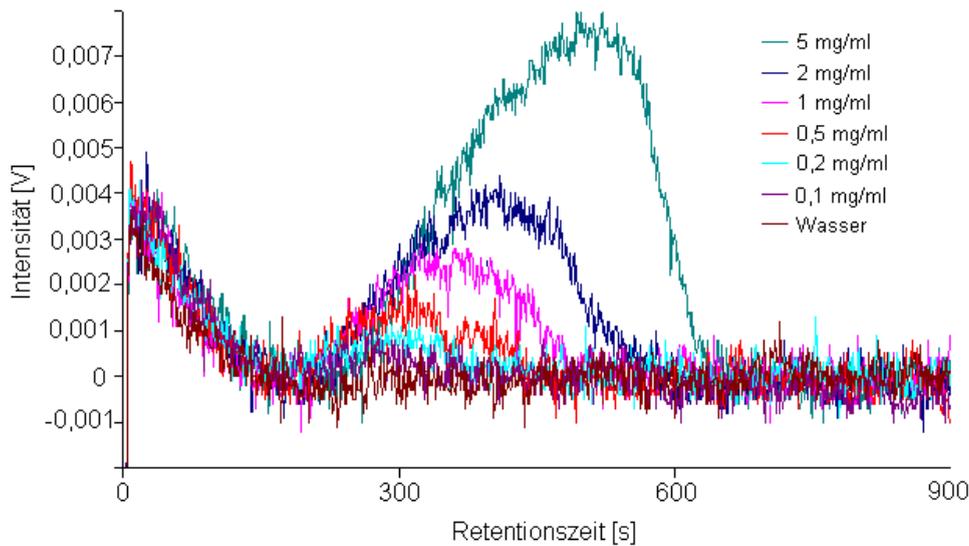


Abbildung 30: Konzentrationsabhängigkeit des Dextran 110kD in der AF⁴

Da Dextrangemische wie erwähnt aufgrund der breiten Größenverteilung nicht getrennt werden und eine lineare Kalibrationskurve nicht erstellt werden konnte (siehe Abbildung 32), wurden zur Kalibration Pullulanstandards eingesetzt. Diese besitzen eine engere Größenverteilung und können daher auch bei Vorliegen von Gemischen getrennt werden.

In Abbildung 31 sind die Retentionszeiten der einzelnen Pullulanstandards dargestellt.

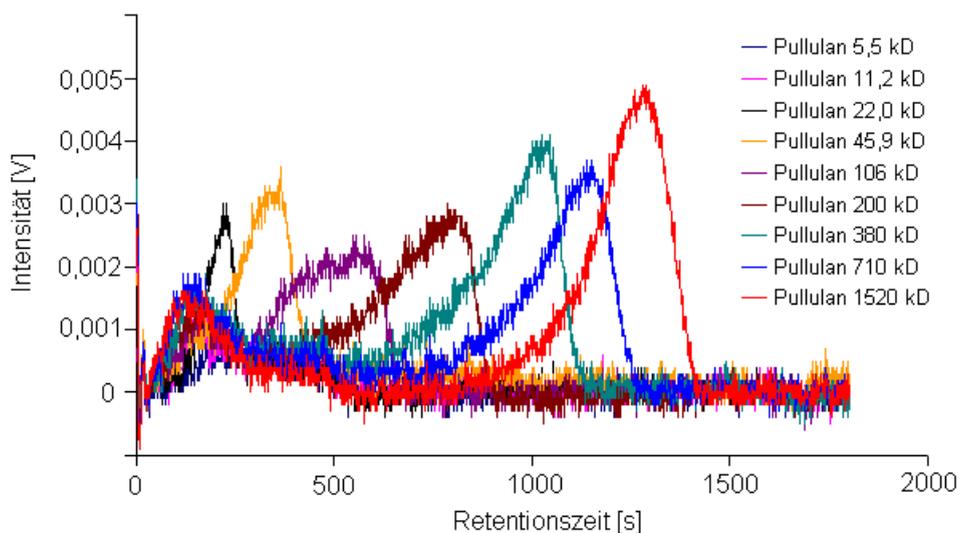


Abbildung 31: Retentionszeiten der verschiedenen Pullulanstandards in der AF⁴

Das „Fronting“ der Peaks entsteht durch unzureichendes Fokussieren der Probe auf der Membran. Es kommt zu unterschiedlichen Gleichgewichtsabständen der Probenmoleküle zur Membran, wodurch geringere Wechselwirkungskräfte auf sie wirken und als Folge die Verbindungen schneller eluiert werden.

Die Kalibrationskurven der Dextran- und Pullulanstandards sind in Abbildung 32 wiedergegeben.

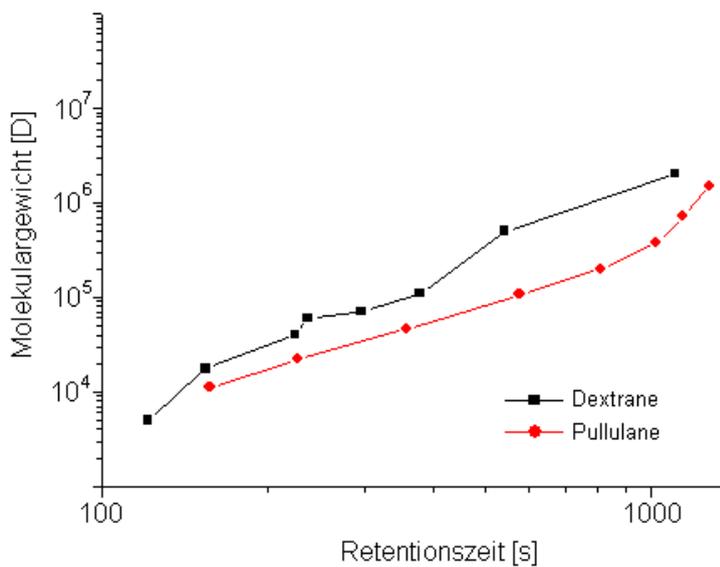


Abbildung 32: Vergleich der Kalibrationskurven der Dextran- und Pullulanstandards

Die Kalibrationskurven zeigen, daß die Pullulane eine präzisere Molekulargewichtsbestimmung zulassen als die Dextrane. Dies bestätigt das Ergebnis von WITTGREN et al. [1997], wonach Pullulane eine engere Molekulargewichtsverteilung im Vergleich zu dem polydisperseren Dextranen aufweisen.

Alle weiteren Größenbestimmungen der pflanzlichen Polysaccharide wurden daher in Relation zu den Pullulanstandards und zwar mit den aufgereinigten Polysaccharide aus *Phyllanthus amarus*, *Cissus quadrangularis* und *Mucuna pruriens* durchgeführt.

In Tabelle 36 sind die Ergebnisse der Größenbestimmung im Vergleich zu den bereits bestimmten Werten der HPGPC-Analytik angegeben.

Polysaccharide aus	AF ⁴ #	HPGPC*	Literatur
<i>Phyllanthus amarus</i>	6	425	-
<i>Mucuna pruriens</i>	10	110	-
<i>Cissus quadrangularis</i>	6	530	-
<i>Larix occidentalis</i>	6	17	37

Tabelle 36: Vergleich der Molekulargewichtsbestimmung durch AF⁴ und HPGPC [kD]

#bezogen auf Pullulanstandards

*bezogen auf Dextranstandards

Obwohl die Kalibrierkurven von AF⁴ (siehe Abbildung 32) und HPGPC (Daten nicht gezeigt) keine auffälligen Abweichungen von der Norm zeigten, wichen die Ergebnisse der pflanzlichen Proben stark voneinander ab. Die HPGPC-Proben wurden anhand der Dextranstandards ausgewertet.

Zur Überprüfung beider Methoden wurde das bekannte neutrale Polysaccharid der Lärche (*Larix occidentalis*) untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, daß es sich um ein neutrales Arabinogalaktan mit einem Molekulargewicht von 37kD handelt [PONDER, 1997, PRESCOTT, 1995].

Zusammenfassung

Die mittels AF⁴ und HPGPC experimentell ermittelten Molekulargewichte des Lärchen-Arabinogalaktans stimmte nicht mit dem aus der Literatur bekannten Wert überein (siehe Tabelle 36). In der Literatur [PONDER, 1997, PRESCOTT, 1995] wurde das Lärchen-Arabinogalaktan durch die Lichtstreuung- und MALDI-TOF-Methode bestimmt. Beide Methoden sind allgemein zur absoluten Molekulargewichtsbestimmung anerkannt.

Die von uns durchgeführten Bestimmungen sind dagegen relative Methoden, wobei das hydrodynamische Volumen der Probe in Relation zu dem hydrodynamischen Volumen der Referenz vermessen wird. Als Ursachen für die Abweichungen kommen in den gemessenen Proben und den Referenzen die unterschiedlichen Primär-, Sekundär- und Tertiärstrukturen in Frage, da diese nur bedingt miteinander verglichen werden.

Zur Lösung des Problems müßten Korrekturfaktoren - beispielsweise in Bezug auf die Struktur oder das hydrodynamische Volumen – berücksichtigt werden. Da diese Korrekturfaktoren experimentell nur sehr schwer zugänglich sind, wurde der Einsatz eines anderen Detektors z.B. eines Lichtstredetektors versucht.

4. MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG VON POLYSACCHARIDEN MITTELS AF⁴, RI- UND LICHTSTREUDETektor

Zur Absolutmassenbestimmung der isolierten Polysaccharide wurde eine AF⁴-Anlage mit einem Brechungsindex- und einem statischen LASER-Lichtstredetektor (SLS) kombiniert.

Das Prinzip eines statischen LASER-Lichtstredetektors (SLS) ist in Abbildung 33 wiedergegeben.

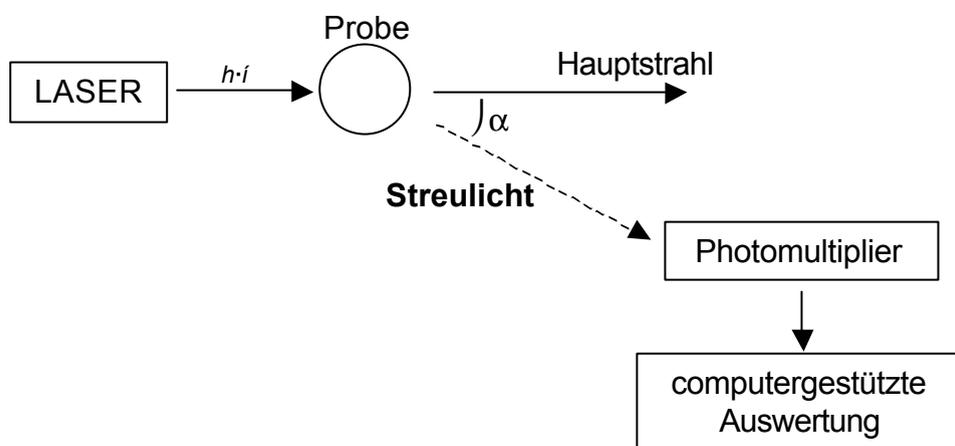


Abbildung 33: Schematische Darstellung eines statischen LASER-Lichtstredetektors (SLS)

Das LASER-Licht wird in die Probe gestrahlt. Der größere Anteil (Hauptstrom) passiert ohne Ablenkung die Probe. Ein geringer Anteil wird an den Probenmolekülen gestreut. Das abgelenkte Licht (Streulicht) kann in Abhängigkeit des Streuwinkels mittels Photomultiplier verstärkt und über den Computer ausgewertet werden.

Bei der statischen Lichtstreuungsverteilung erhält man Informationen über das Molekulargewicht, den Gyrationradius und die dreidimensionale Struktur der gelösten Moleküle.

Der SLS-Detektor kann die molare Masse - aber nicht die Konzentration - bestimmen, da die Empfindlichkeit nicht linear mit der Probengröße zunimmt. Aus diesem Grund muß parallel mit einem RI-Detektor die Konzentration bestimmt werden. Erst durch Kombination ist es möglich, sowohl die Konzentration als auch die Molekulargewichte online zu bestimmen.

In Abbildung 34 sind exemplarisch die Meßwerte des Polysaccharids aus *Phyllanthus amarus* dargestellt.

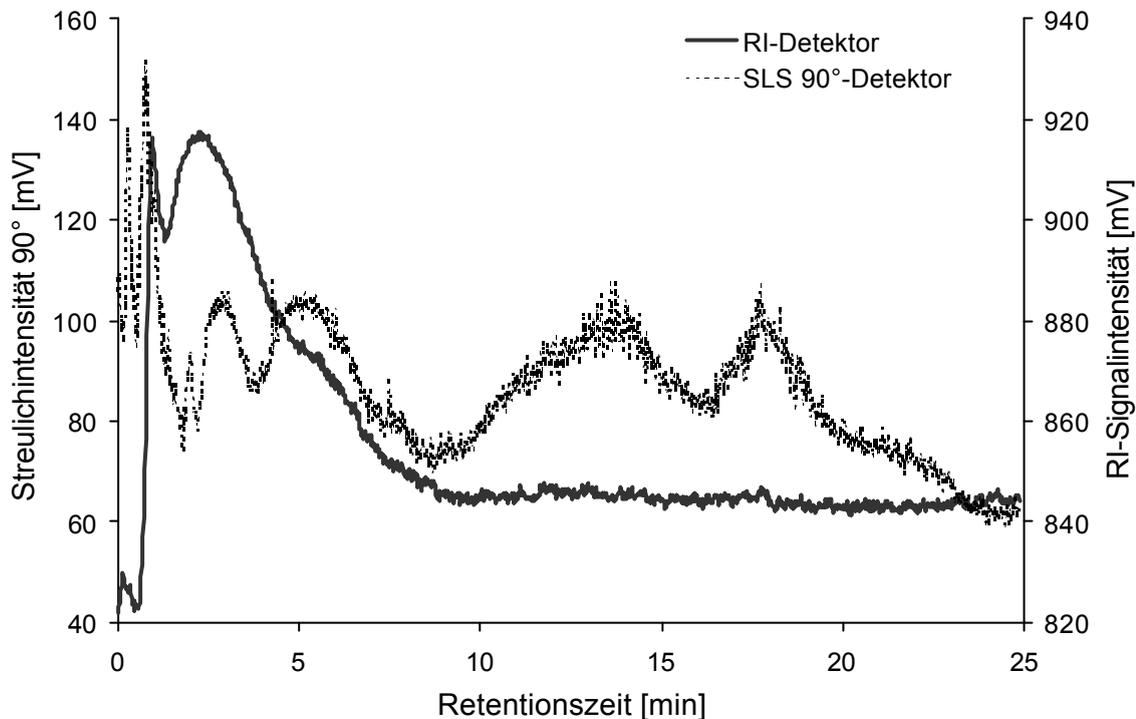


Abbildung 34: Fraktogramm des Polysaccharids aus *Phyllanthus amarus* mit RI und SLS 90°-Detektion

In Abbildung 34 ist anhand des Verlaufs des RI-Detektorsignals gut zu erkennen, daß nur im Retentionsbereich von etwa 1,5-10min die Probe eluiert. Im späteren Bereich nimmt die Empfindlichkeit des SLS-Detektors stark zu, so daß es zu den beiden Signalen bei 13,7min und 17,8min kommt. Bezieht man aber für diese Retentionszeiten das RI-Signal mit ein, so erkennt man, daß so gut wie keine Probenmoleküle mehr eluieren. Hieraus ergibt sich, daß die Hauptkomponente bei ca. 1,5-10,5min eluiert, was nach Auswertung des SLS-Signals einem Molekulargewicht von 259kD entspricht.

In Tabelle 37 sind die Ergebnisse der Pflanzenproben der unterschiedlichen Trennverfahren und Detektoren zusammengestellt:

Polysaccharide aus	Molekulargewicht [kD]		
	RI-Detektor ^a		SLS-RI-Detektor ^b
	AF ⁴	HPGPC [*]	AF ⁴
<i>Phyllanthus amarus</i>	6	425	259
<i>Mucuna pruriens</i>	10	110	168
<i>Cissus quadrangularis</i>	6	530	272

Tabelle 37; Vergleich der Molekulargewichtsbestimmung durch AF⁴ und HPGPC bei verschiedenen Detektoren
relative^a und absolute^b Molekulargewichtsbestimmung
^{*}bezogen auf Dextranstandards

Wie aus Tabelle 37 hervorgeht, weichen auch die mit SLS-RI-Detektor ermittelten Molekulargewichte von den Werten der beiden anderen Verfahren ab. Die bestimmten absoluten Molekulargewichte der pflanzlichen Polysaccharide liegen sowohl unter (*Phyllanthus amarus* = 259kD, *Cissus quadrangularis* = 272kD) als auch über (*Mucuna pruriens* = 168kD) den Werten der HPGPC-Analysen. Die Werte der AF⁴-Analytik sind viel zu niedrig, vor allem wenn man berücksichtigt, daß die Polysaccharide während der Aufreinigung mehrmals gegen ein Ausschlußvolumen von 12-14kD dialysiert wurden.

Zusammenfassung

Die Methoden der relativen Molekulargewichtsbestimmung von sauren pflanzlichen Heteroglycanen mittels HPGPC oder AF⁴ in Kombination mit einem Brechungsindex-Detektor ((RI)-Detektor) sind nicht geeignet (siehe Tabelle 37). Die üblicherweise eingesetzten Standardverbindungen (Dextrane, Pullulane = Homoglycane) zur Eichung des Verfahrens sind sowohl in der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur (lineare Standards vs. hochverzweigte Proben) als auch in ihrem Trennverhalten (neutrale Homoglycane vs. saure Heteroglycane) gegenüber den untersuchten Heteroglycanen zu unterschiedlich.

Aus diesen Gründen ist eine Molekulargewichtsbestimmung auf der Basis der derzeit zugänglichen Standardsubstanzen in Kombination mit einem RI-Detektor nur sehr eingeschränkt aussagekräftig und somit als Routineverfahren nicht geeignet.

Zur Molekulargewichtsbestimmung mittels AF⁴ und RI-Detektor schlugen HEGENDORF et al. [2001] die Einführung eines substanzspezifischen „Formfaktors“ vor. Jedoch ist die Bestimmung eines „Formfaktors“ (entspricht dem hydrodynamischen Volumen) mit erheblichem experimentellen Aufwand oder dem Einsatz teurer Detektoren verbunden. Dies wiederum verhindert einen schnellen routinemäßigen Einsatz dieser Methode.

Eine Aussage über das Molekulargewicht der hochkomplexen pflanzlichen Polysaccharide ist somit nur über eine absolute Molekulargewichtsbestimmung möglich. Hierzu wurde ein SLS-Detektor mit einer AF⁴-Anlage gekoppelt.

Die AF⁴-Anlage wurde ausgewählt, um die bei der Gelpermeationschromatographie auftretende Wechselwirkungen mit der stationären Phase wie Adsorption, Ionenausschluß (Veränderung des Porenvolumens) und Degradierung (z.B. durch Strukturverlängerung aufgrund des Strömungsflusses) zu vermeiden.

Der SLS-Detektor bestimmt das absolute Molekulargewicht über die Lichtstreuung an den Probenmolekülen, wodurch Standards überflüssig werden.

Durch Einsatz einer Kopplung aus AF⁴ und LASER-Lichtstredetektor konnten bereits PICTON et al. [2000] Polysaccharide aus *Acacia senegal* auftrennen und charakterisieren.

Ein anderes Verfahren der absoluten Molekulargewichtsbestimmung, das derzeit auch angewandt wird, ist eine spezielle Art der Massenspektrometrie, die „matrix-assisted laser desorption/ionisation – time of flight“-Methode (MALDI-TOF). Hierbei wird die Probe mittels LASER aus einer Matrix schonend ionisiert und anschließend werden die Massenfragmente anhand der „Flugzeit“ analysiert. Dieses Verfahren wird bereits zur Strukturaufklärung von Oligosacchariden und Polysacchariden eingesetzt [HARVEY, 1996, VENKATARAMAN, 1999]. Da die Obergrenze der zu erfassenden Molekulargewichte derzeit noch bei 200kD liegt, konnte das MALDI-TOF-Verfahren zur Strukturaufklärung der im Rahmen dieser Arbeit isolierten pflanzlichen Polysaccharide nicht eingesetzt werden.

F PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

1. PRÜFUNG VON POLYSACCHARIDEN AUF ZYTOTOXIZITÄT

Um einen möglichen toxischen Einfluß von Roh- und Polysaccharide auf Zellsysteme auszuschließen, wurde exemplarisch die Rohpolysaccharidfraktion aus der 1+1-Fällung von *Phyllanthus amarus* im Tetrazolium-Vitalitätstest untersucht.

Die Grundlage des Test besteht in einer Spaltung von dem Tetrazoliumsalz WST-1 zu dem Farbstoff Formazan durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System, das zu der Atmungskette der Mitochondrien gehört und nur in lebenden Zellen aktiv ist. Die gebildete Menge an Farbstoff ist direkt proportional zu der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen und durch Messung der Absorption der Farbstofflösung kann die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt werden.

In Konzentrationen von 5-500µg/ml wurden bei HepG2-Zellen keine Zytotoxizität festgestellt, d.h. selbst hohe Konzentrationen von bis zu 500µg/ml hatten *in vitro* nach 12h keinen zytotoxischen Effekt auf die Vitalität der Zellen.

2. AKTIVIERUNG DER UNSPEZIFISCHEN IMMUNABWEHR DURCH POLYSACCHARIDE

An der unspezifischen Immunabwehr sind die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten maßgeblich beteiligt [MUTSCHLER, 1996, SZALAY, 1997, THEWS, 1999]. Die neutrophilen Granulozyten sind zur Produktion von Sauerstoffradikalen, Phagozytose und zur Degranulation von proteolytischen Vesikeln befähigt. Zu den Phagozyten werden die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (= Mikrophagen) sowie Monozyten (= Makrophagen) gezählt. Sie spielen bei der Elimination pathogener Mikroorganismen eine zentrale Rolle.

Der Vorgang der Phagozytose selbst kann aufgeteilt werden in:

- Anlockung der Phagozyten durch Bakteriengifte, Stoffe des Zellzerfalls oder fremde Zellen,
- Oponierung (durch Bestandteile des Komplementsystems),
- Adhärenz der Membranrezeptoren,
- Invagination der Zellmembran,
- Bildung des Phagosoms,
- Bildung des Phagolysosoms und
- Abbau bzw. intrazelluläre Modifikation.

Ein zweiter Abwehrmechanismus steht mit der sogenannten "oxidative burst"-Aktivität zur Verfügung. Dieser Vorgang beinhaltet eine durch Induktion von Neutrophilen erzeugte rasche Freisetzung großer Mengen an Sauerstoffradikalen, die durch aktivierte NADPH-Oxidase gebildet werden und eingedrungene Mikroorganismen sowohl intrazellulär als auch extrazellulär schädigen können. Über den Mechanismus der Erzeugung der Sauerstoffradikale gibt es umfangreiche Literatur [z.B. EDWARDS, 1996]. Obwohl die Phagozytose- und die "oxidative burst"-Aktivität in den meisten Fällen miteinander korrelieren, gibt es Fälle, bei denen der eine Vorgang nicht unbedingt den anderen auslöst. Die "oxidative burst"-Aktivität und die Phagozytose spielen bei der Eliminierung von pathogenen Mikroorganismen und bei allen Entzündungsvorgängen eine wichtige Rolle.

2.1. Phagozytoseinduktion durch Polysaccharide

Zur Bestimmung der Phagozytose-Aktivität nach Exposition mit Polysacchariden wird heute die Durchflußzytometrie nach Anfärben der Phagozyten mit einem Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, die rasch und einfach Ergebnisse mit hoher Präzision und Reproduzierbarkeit liefert.

Das Prinzip der Bestimmung beruht auf der Erkennung verschiedener Zellpopulationen in Vollblut anhand ihrer spezifischen Größe und Granularität. Aufschluß darüber erhält man durch das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht eines Lasers, das durch Reflexion an Bestandteilen der Probe entsteht. Mittels des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffs können einzelne Zellen, Zellbestandteile oder DNA-Fragmente angefärbt und auf diese Weise ihre Zahl und Veränderungen ihrer Eigenschaften festgestellt werden. Die unterschiedlich ausgesandten Fluoreszenzen werden detektiert, wodurch Informationen über die Kriterien „lebend“ oder „tot“ bzw. „phagozytiert habend“ oder „noch nicht phagozytiert habend“ erhalten werden können.

Anhand eines Zeitverlaufs der Phagozytose-Aktivität in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration (siehe "oxidative burst"-Aktivität) wurde auch hier eine optimale Konzentration von 10µg/ml festgestellt. Diese Konzentration wurde zur Bestimmung des Einflusses der Roh- und Polysaccharidfraktionen auf die Phagozytose-Aktivität eingesetzt.

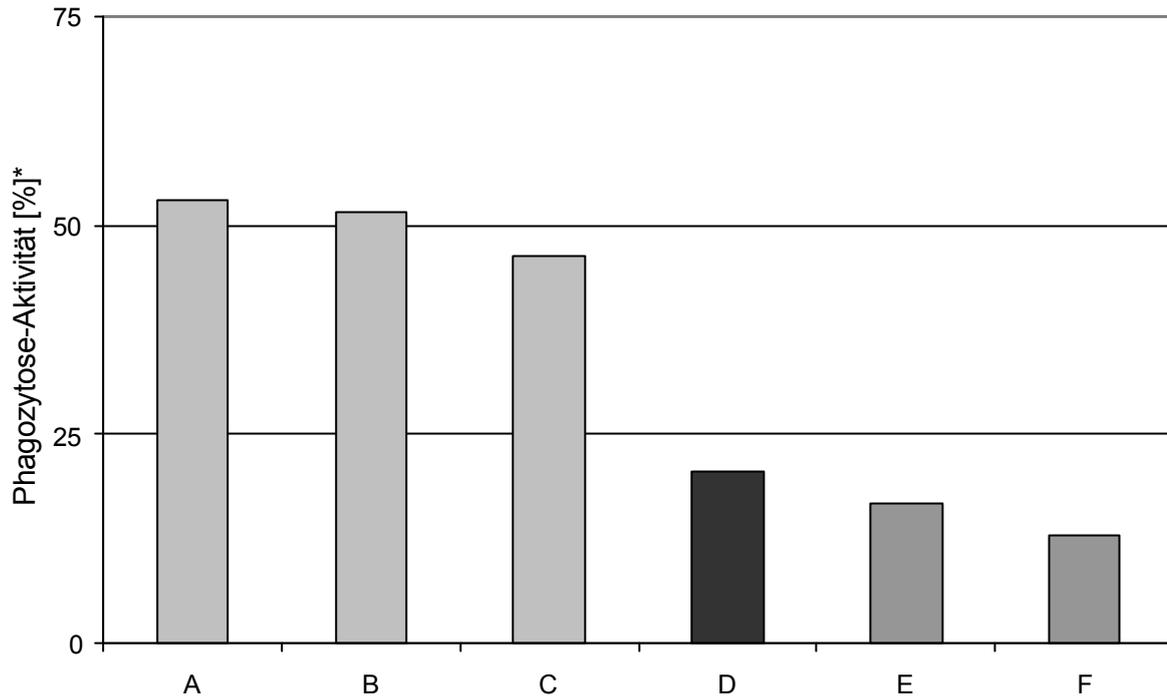


Abbildung 35: Prozentuale Phagozytoseaktivität verschiedener Roh-/Polysaccharide gegenüber dem Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* in einer Dosierung von 10µg/ml
 *Prozent als relative Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle (auf 0% gesetzt)
 A = *Phyllanthus amarus* Rohpolysaccharid 1+1-Fällung
 B = *Phyllanthus amarus* Rohpolysaccharid 1+4-Fällung
 C = *Phyllanthus amarus* Hauptpolysaccharid B
 D = *Mucuna pruriens* Rohpolysaccharid 1+1-Fällung
 E = *Cissus quadrangularis* Rohpolysaccharid 1+1-Fällung
 F = *Cissus quadrangularis* Hauptpolysaccharid B

Alle getesteten Roh- und Polysaccharidfraktionen waren in der Lage, die Phagozytoseaktivität zu erhöhen. Die drei verschiedenen *Phyllanthus*-Fraktionen stimulierten die Phagozytoseaktivität am besten; auch die Fraktionen aus *Mucuna* und *Cissus* konnten einen positiven Effekt erzielen.

Bei den *Phyllanthus*-Fraktionen sind die Rohpolysaccharid-Fällungen potenter als die Hauptkomponente (Polysaccharid B), d.h. neben der Hauptkomponente kommen noch weitere Verbindungen in den Rohfällungen vor, die synergistisch die Aktivierung der Phagozytose-Aktivität steigern. Ähnliches ist auch bei den *Cissus*-Fraktionen zu beobachten; auch hier erwies sich die Rohfällung aktiver als die isolierte Hauptkomponente.

In der Literatur wurden bereits sehr viele Polysaccharide beschrieben, die die Phagozytose-Aktivität steigern. Beispielsweise isolierte INGOLFSDOTTIR [2000] aus *Cetraria islandica* ein Galaktomannan, das *in vitro* im menschlichen Granulozyten-Modell in einer Konzentration von 100µg/ml eine Steigerung der Phagozytose-Aktivität um 68%, bei 10µg/ml um 24% und bei 1µg/ml um 14% hatte.

SCHÖLLHORN [1994] fand eine *in vitro*- und *in vivo*-Stimulierung der Phagozytose-Aktivität bei den aus *Withania somnifera* isolierten Polysacchariden. Hochaktiv war das saure Arabinorhamnogalaktan im Carbon-Clearance-Test und im durchflußzytometrischen Phagozytostest, wohingegen das neutrale Polysaccharid (Galaktoglucan) nur eine moderate Wirkung hatte. So konnte das saure Arabinorhamnogalaktan die Phagozytose-Aktivität bei der Konzentration von 100µg/ml um 74% und bei 10µg/ml um 40% steigern. Aus diesen Ergebnissen schloß SCHÖLLHORN, daß die sauren Polysaccharide aus *Withania somnifera* als ein wesentliches immunmodulierendes Wirkprinzip betrachtet werden können. Aus *Echinacea purpurea* wurden von WAGNER et al. [1985, 1988] ein Arabinogalaktan isoliert, das die Phagozytose stimulierte. Der Effekt wurde sowohl *in vivo* im Carbon-Clearance-Test an Mäusen in einer Dosis von 10ml/kg KG beobachtet als auch *in vitro* an polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) im menschlichen Plasma; hier wurde bei einer Konzentration von 10µg/ml die Phagozytose-Aktivität um 32% gesteigert.

In vivo konnten PEREIRA et al. [2000] an Mäusen mittels Carbon-Clearance-Test zeigen, daß die aus *Periandra mediterranea* isolierten hochverzweigten Glucane bei Gabe von 50µg/g KG über 5 Tage eine Steigerung der Phagozytose-Aktivität von 16% bis 291% gegenüber der Kontrollgruppe bewirkten.

Auffallend ist, daß das von KRAUS [1998] isolierte lineare Glucan aus *Urtica dioica* die Phagozytose-Aktivität (<10% bei 10µg/ml) nur sehr schwach stimulierte. Auch das neutrale Galaktoglucan aus *Withania somnifera* steigerte die Phagozytoserate nur sehr schwach (13% bei 10µg/ml) [SCHÖLLHORN, 1994].

Die isolierten Polysaccharide aus *Phyllanthus amarus* und *Cissus quadrangularis* aktivieren die Phagozytose in ähnlichen Konzentrationen wie vergleichbare in der Literatur beschriebene Polysaccharide.

Beim Vergleich der Literaturdaten mit den Ergebnissen der Hauptpolysaccharide aus *Phyllanthus amarus* und *Cissus quadrangularis* stellt man fest, daß tendenziell saure Polysaccharide die Phagozytose-Aktivität besser steigern als neutrale Polysaccharide. Ferner scheint die Aktivität mit zunehmendem Uronsäureanteil gesteigert zu werden. Dieser Zusammenhang wird deutlich, wenn man den Uronsäureanteil bei einer bestimmten Konzentration vergleicht (Tabelle 38).

Pflanze	Strukturtyp	Uronsäureanteil [%]	Phagozytose-Aktivität [%]*	Literatur
<i>Thuja occidentalis</i>	Fucogalaktoxyloglucan	0	+10	FISCHER, 1992
<i>Sabal serrulata</i>	Galaktomannan	0	+30	FISCHER, 1992
<i>Cetraria Islandica</i>	Galaktomannan	0	+24	INGOLFSDOTTIR, 2000
<i>Urtica dioica</i>	Glucan	2	+6	KRAUS, 1998
<i>Echinacea purpurea</i>	Arabinogalaktan	9	+27	WAGNER, 1985
<i>Thuja occidentalis</i>	Glucomannan	36	+2	FISCHER, 1992
<i>Cissus quadrangularis</i>	Xyloarabinomannogalaktan	43	+13	diese Arbeit
<i>Withania somnifera</i>	Arabinorhamnogalaktan	63	+40	SCHÖLLHORN, 1994
<i>Phyllanthus amarus</i>	Arabinorhamnogalaktan	73	+46	diese Arbeit
<i>Rumex acetosa</i>	Arabinorhamnogalaktan RW-S1	78	+34	SCHWARTNER, 1995, 1996
<i>Rumex acetosa</i>	Arabinorhamnogalaktan RW-S2	85	+54	SCHWARTNER, 1995, 1996

Tabelle 38: Vergleich der Phagozytose-Aktivität verschiedener saurer Polysaccharide
*Steigerung relativ zur Negativkontrolle, c = 10µg/ml

Wie aus Tabelle 38 zu entnehmen, ist diese Tendenz aber nur eingeschränkt gültig. Die Polysaccharide aus *Cetraria* und *Cissus* (Galaktomannan bzw. Xyloarabinomannogalaktan) z.B. dürften als Ausnahme gelten. Folglich kann der Uronsäureanteil nicht allein dafür verantwortlich sein, ob ein Polysaccharid die Phagozytose-Aktivität steigert oder nicht. Weitere Gründen liegen höchstwahrscheinlich in der Komplexizität der Feinstruktur, den Verknüpfungsarten und den damit verbundenen Sekundär- sowie Tertiärstrukturen. Eine weitere systematische Untersuchung ist nötig, um eine genaue Struktur-Wirkungs-Beziehung zu erhalten.

2.2. Steigerung der „oxidative burst“-Aktivität durch Polysaccharide

Die Bestimmung der „oxidative burst“-Aktivität kann durch Messung der erhöhten Chemilumineszenz von Luminol oder Lucigenin erfolgen [WAGNER, 1991]. Die heute zum Screening genutzte Methode ist die Durchflußzytometrie im Vollblut (siehe Kapitel 2.1., Seite 115).

Die Bestimmung der „oxidative burst“-Aktivität wurde mittels Durchflußzytometrie an Vollblut freiwilliger Spender durchgeführt. Die Aktivität wird anhand des zuerst farblosen Farbstoffs Dihydroethidium (DHE) ermittelt, der nach Diffusion in die Zelle durch die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) der phagozytierenden Zellen oxidiert wird und dann als rote Fluoreszenz spezifisch vermessen werden kann. In dieser Methode sind DNA der abgestorbenen Zellen rot und die Phagozyten orange angefärbt.

Exemplarisch ist der Zeitverlauf der „oxidative burst“-Aktivität unter Einfluß des Hauptpolysaccharids aus *Phyllanthus amarus* in Abhängigkeit der Konzentration dargestellt (siehe Abbildung 36).

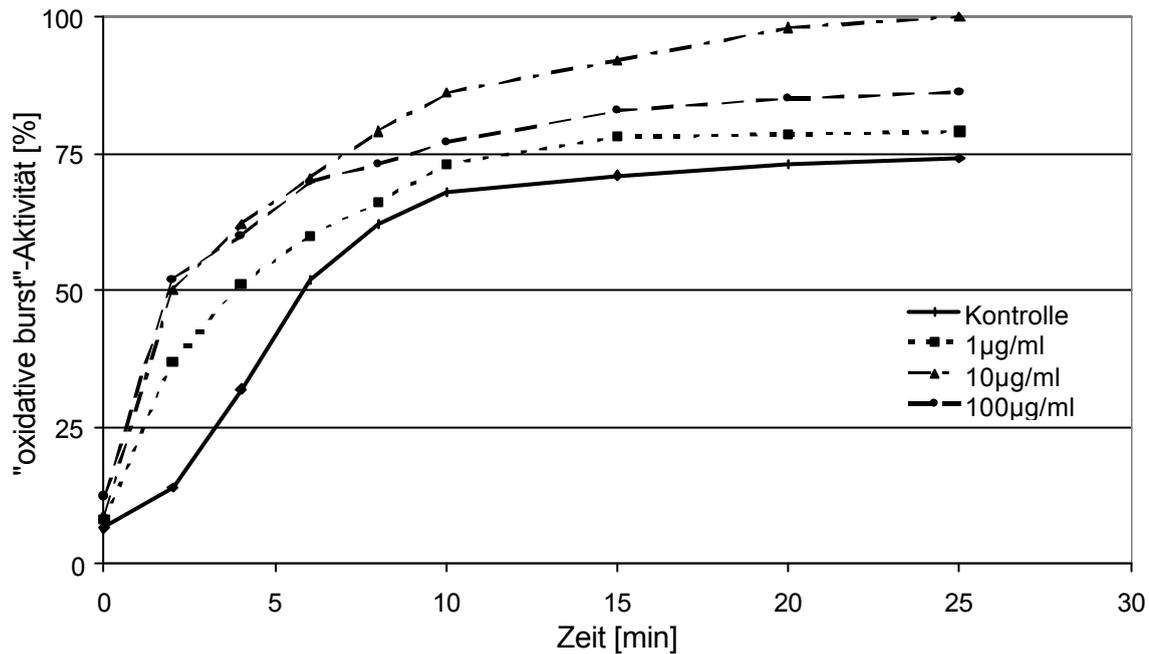


Abbildung 36: Zeitverlauf der „oxidative burst“-Aktivität gegenüber dem Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Hauptpolysaccharids aus *Phyllanthus amarus*

Man kann erkennen, daß eine Dosis-Wirkung-Beziehung besteht. Bei einer Konzentration von 1 µg/ml ist eine leichte Aktivierung zu erkennen. Bei 10 µg/ml ist die stärkste Aktivierung zu beobachten, die bei weiterer Konzentrationserhöhung (100 µg/ml) absinkt.

Die optimale Testkonzentration betrug 10 µg/ml, weshalb zur Bestimmung der „oxidative burst“-Aktivität der unterschiedlichen Roh- und Polysaccharidfraktionen diese Konzentration eingesetzt wurde (siehe Abbildung 37).

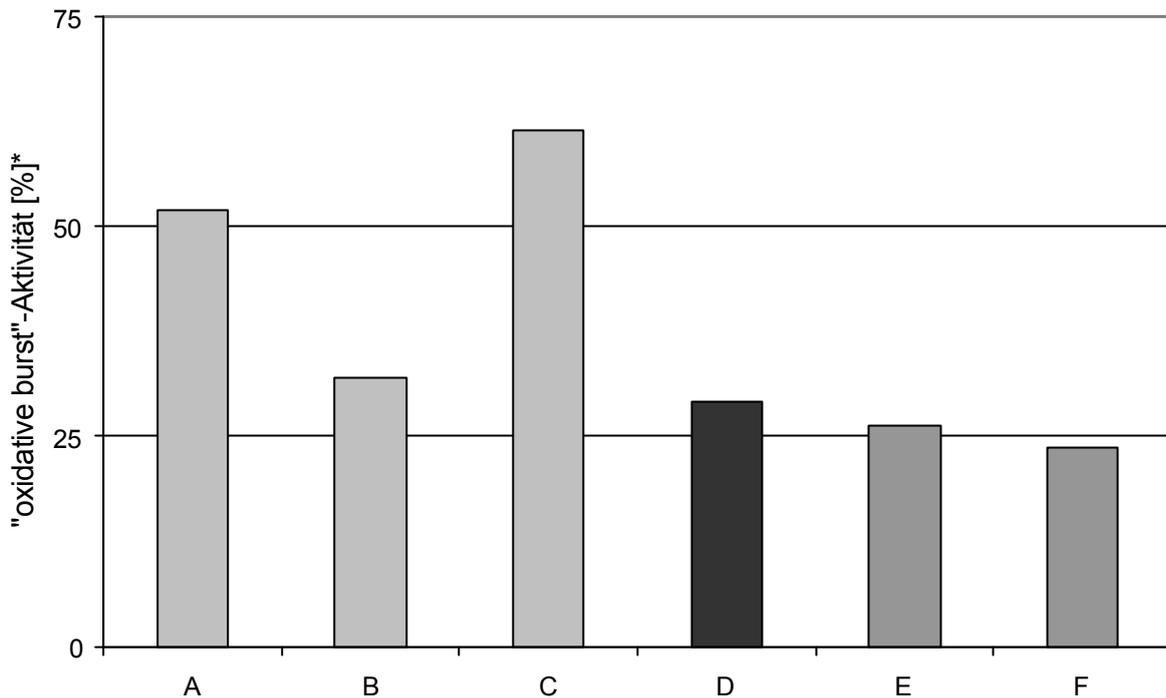


Abbildung 37: Prozentuale „oxidative burst“-Aktivität gegenüber dem Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* unter Einfluß verschiedener Roh- und Polysaccharidfraktionen in einer Dosierung von 10µg/ml

*Prozent als relative Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle (auf 0% gesetzt)

A = *Phyllanthus amarus* Rohpolysaccharid 1+1-Fällung

B = *Phyllanthus amarus* Rohpolysaccharid 1+4-Fällung

C = *Phyllanthus amarus* Hauptpolysaccharid B

D = *Mucuna pruriens* Rohpolysaccharid 1+1-Fällung

E = *Cissus quadrangularis* Rohpolysaccharid 1+1-Fällung

F = *Cissus quadrangularis* Hauptpolysaccharid B

Alle getesteten Roh- und Polysaccharidfraktionen konnten die „oxidative burst“-Aktivität steigern. Die drei verschiedenen *Phyllanthus*-Fraktionen stimulierten die Aktivität am stärksten; auch die Fraktionen aus *Mucuna* und *Cissus* erzielten einen Effekt.

Unter den *Phyllanthus*-Fraktionen hatte die Rohpolysaccharid 1+4-Fällung den geringsten Einfluß auf die Aktivität. Die Rohpolysaccharid 1+1-Fällung führte zu einer hohen „oxidative burst“-Aktivität. Das daraus isolierte Hauptpolysaccharid induzierte sogar eine noch höhere Aktivität. Somit scheint das Hauptpolysaccharid größtenteils für die Aktivität verantwortlich zu sein. In der 1+1-Rohfällung wirken die Begleitkomponenten schwach antagonistisch bzw. hemmend auf die „oxidative burst“-Aktivität.

Bis Mitte der neunziger Jahre war es üblich, die aktiven Sauerstoffspezies in einer angereicherten Granulozyten-Fraktion mittels Luminol bzw. Lucigenin zu messen. Mit dieser Methode wurde beispielsweise die Aktivität des aus *Echinacea purpurea* isolierten Arabinogalaktans bestimmt [LOHMANN-MATTHES, 1989]. Das Polysaccharid konnte dosisabhängig die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies in Mäusemakrophagen in dem Lucigenin/Zymosan-Chemilumineszenz-Assay steigern. Eine Erhöhung der Dosis führte zu einer Hemmung der ROS-Produktion. PUHLMANN [1989, 1991, 1992] isolierte aus *Achyrocline satureioides* zwei Arabinorhamnogalaktane, die die „oxidative burst“-Aktivität in einer Konzentration von 10µg/ml um 18% bzw 33% steigerten (Bestimmung nach dem Chemilumineszenzverfahren).

Pflanze	Typ	Uronsäureanteil [%]	„ox. burst“-Aktivität [%]*	Literatur
<i>Arnica montana</i>	Arabinogalaktan A II	18	+8 [£]	PUHLMANN, 1991
<i>Cissus quadrangularis</i>	Xyloarabinomannogalaktan	43	+23 [¥]	diese Arbeit
<i>Achyrocline satureioides</i>	Arabinorhamnogalaktan AS3	65	+18 [£]	PUHLMANN, 1992
<i>Achyrocline satureioides</i>	Arabinorhamnogalaktan AS4	66	+33 [£]	PUHLMANN, 1992
<i>Phyllanthus amarus</i>	Arabinorhamnogalaktan	73	+61 [¥]	diese Arbeit

Tabelle 39: Vergleich der „oxidative burst“-Aktivität verschiedener saurer Polysaccharide

*Steigerung relativ zur Negativkontrolle, c = 10µg/ml

[£]Chemilumineszenz-Methode

[¥]Durchflußzytometrie-Methode

Eine tendenzielle Zunahme der „oxidative burst“-Aktivität ist mit steigendem Uronsäureanteil zu erkennen.

Ferner konnten aus den Zellwänden verschiedener Bakterien (*Saccharomyces* [WAKSHULL, 1999], *Pseudomonas* [PASQUIER, 1997], *Salmonella* [CHATEAU, 1997], etc.) verschiedene Polysaccharide isoliert werden, die dosisabhängig die „oxidative burst“-Aktivität steigerten.

Im Gegensatz zu den beschriebenen positiven Ergebnissen fanden SALIH et al. [1997] bei Heparin, daß es die „oxidative burst“-Aktivität, durchflußzytometrisch im menschlichen Vollblut gemessen, dosisabhängig signifikant senkt.

These

Der Uronsäureanteil scheint nicht zwingend das Hauptstrukturmerkmal für die Steigerung der „oxidative burst“-Aktivität zu sein, da beispielsweise das von PUHLMANN [1989, 1991, 1992] isolierte Arabinorhamnogalaktan mit einem Uronsäureanteil von 65% eine vergleichsweise schwache Wirkung aufweist.

Die Verknüpfungsarten und Verzweigungsgrade sowie die Sekundär- und Tertiärstrukturen spielen für die Wirksamkeit eine große Rolle. Eine weitere systematische Untersuchung ist nötig, um eine Struktur-Wirkungs-Beziehung feststellen zu können.

2.3. Zusammenfassung

Bei der induzierten unspezifischen Immunabwehr werden verschiedene Mechanismen wie Phagozytose und „oxidative burst“ aktiviert.

Beim Vergleich der Daten aus den beiden Testmodellen ergibt sich, daß alle isolierten Roh-/Polysaccharide in der Lage waren, beide Aktivitäten zu steigern.

Bei dem Hauptpolysaccharid aus *Phyllanthus amarus* fällt auf, daß die Aktivierung der Phagozytose gegenüber der entsprechenden Rohfällung abnimmt, die „oxidative burst“-Aktivität jedoch zunimmt.

Ob man aus diesem Vergleich jedoch auf unterschiedliche Angriffspunkte der Polysaccharide schließen kann, ist nicht gesichert und bedarf weiterer Untersuchungen

3. **UNTERSUCHUNGEN VON POLYSACCHARIDEN AUF ANTIVIRALE AKTIVITÄT**

Die antivirale Wirkung von Polysacchariden ist in der Literatur häufig beschrieben worden [z.B. VLIETINCK, 1998]. Die wirksamen Substanzen sind überwiegend sulfatierte Polysaccharide, die aus Pflanzen, Moosen oder Algen sowie aus Pilzen, Bakterien und marinen Organismen isoliert oder semisynthetisch hergestellt wurden, wie beispielsweise das sulfatierte Dextran. Eine Ausnahme macht das neutrale Glucan aus dem Pilz *Sclerotium gluconicum*, das offenbar direkt antiviral auf *Herpes simplex*-Viren wirkt [MARCHETTI, 1996]. Sowohl sulfatierte Homo- als auch Heteroglykane aus verschiedenen Algen besitzen *in vitro* eine starke antivirale Aktivität, wobei unterschieden werden muß zwischen einer direkten und immuninduzierten, z.B. über die Induktion von Interferon, zustande kommende Wirkung.

3.1. **Wirkung von Polysacchariden auf das Hepatitis B Virus**

Da *Phyllanthus amarus*-Drogenpulver und wässrige Extrakte volksmedizinisch zur Behandlung von viralen Lebererkrankungen (Hepatitis) angewandt wurden und bisher nicht bekannt war, welche Substanzklassen für die hepatoprotektive bzw. antivirale Wirkung verantwortlich sind, wurde das isolierte saure Arabinorhamnogalaktan auf eine mögliche Wirkung auf die Genexpression und die virale Replikation des *wild type* Hepatitis B Virus *in vitro* an Leberzellen (HepG2.2.15) getestet.

Hierzu wurden die infizierten Leberzellen mit der Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen (1, 10, 25 und 50µg/ml) 7 Tage lang inkubiert. Anschließend wurden die Zellen homogenisiert und fraktioniert. Die Bestimmung der viralen DNA wurde über Southern-Blot und Radioaktivmarkierung durchgeführt.

Das saure Arabinorhamnogalaktan erwies sich *in vitro* nicht in der Lage, in Konzentrationen von 1-50µg/ml die *de novo* DNA-Synthese des *wild type* Hepatitis B Virus in Leberzellen signifikant zu hemmen. Dieses erste Versuchsergebnis ist noch kein Beweis für die grundsätzliche antivirale Unwirksamkeit von Polysacchariden gegenüber Hepatitis-Viren, da noch nicht geprüft wurde, ob eine Abhängigkeit der Wirkung von Molekulargewicht, Strukturtyp und Zuckerzusammensetzung besteht.

ZHANG et al. [1995] konnten zeigen, daß ein aus Astragalus-Wurzeln isoliertes komplexes Glucan *in vitro* signifikant die virale HBV-DNA-Menge reduzierte. In einem kürzlich von KHOTIMCHENKO et al. [2000] an Mäusen beschriebenen Versuch, bei denen durch Tetrachlorkohlenstoff eine toxische Hepatitis induziert worden war, waren verschiedene Polysaccharide (Calcium-Alginat, niedrig methoxylierte Pektine, Fucoidan und Chitosan) in der Lage, in Dosen von 150mg/kg KG über 14-21 Tage gegeben den totalen Lipid- und Glykogengehalt der Leber zu verbessern. Allerdings läßt dieses Ergebnis keine absolute Aussage über eine antivirale Wirkung zu. Bei oraler Gabe an Patienten wurde ebenfalls die HBV-DNA-Menge im Plasma im Vergleich zur Kontrollgruppe gesenkt.

Da sulfatierte Polysaccharide in einem Anti-HBV-Modell nicht getestet werden konnten, muß die Frage nach einer möglichen anti-Hepatitis B oder C-Wirkung von genuinen oder chemisch abgewandelten Polysacchariden noch offen bleiben.

3.2. Wirkung von Polysacchariden auf die „Human Immundeficiency Virus“ (HIV) -Replikation

Die Virus-Zell-Interaktion bei der *in vitro*-Infizierung mit HIV-1/-2 ist inzwischen sehr gut untersucht. Durch Interaktion des viralen Hüllenglycoproteins mit dem CD₄-Rezeptor der Wirtszelle bindet das Virus an die Zelle. Anschließend erfolgt die Zellverschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran, wobei wiederum verschiedene virale Glycoproteine beteiligt sind. Nach Zellverschmelzung entsteht mit Hilfe der reversen Transkriptase aus der viralen RNA die provirale DNA, die durch die Integrase in die DNA der Wirtszelle eingebaut wird. Die virale DNA kann nun von der Wirtszelle abgelesen werden, so daß die nächste Virengeneration gebildet wird (siehe Abbildung 38).

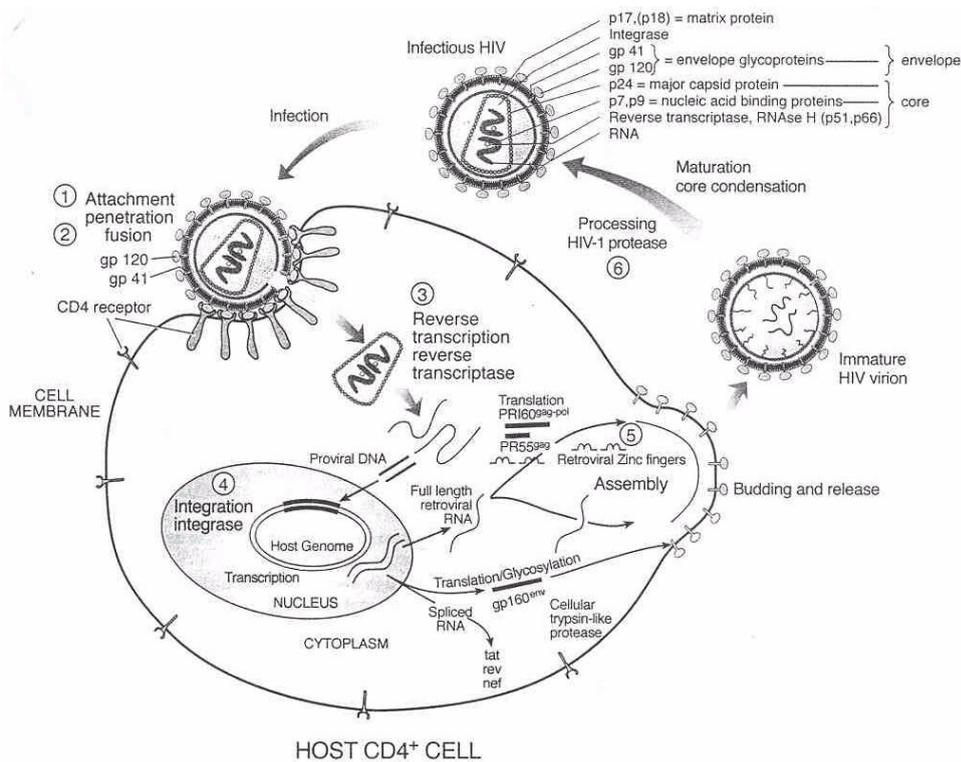


Abbildung 38: Verschiedene Phasen des Replikationszyklus des HIV-1 bei der Infektion einer T-Zelle [YANG, 2001]

Der Eingriff eines aktiven Polysaccharids erfolgt bereits im ersten Schritt bei der Zelladhäsion. Das Polysaccharid bindet zum einen aufgrund seines polyanionischen Charakters an das Virus und verhindert dadurch die Interaktion des viralen Hüllenglykoproteins mit dem CD₄-Rezeptor der Zelle. Zum anderen bindet es selbst an den CD₄-Rezeptor der Zelle und verhindert so kompetitiv die virale Infektion. Ferner hemmen Polysaccharide und sulfatierte Derivate die Ausbildung des für HIV typischen Synzytiums. Anders als bei den derzeit eingesetzten Medikamenten (z.B. AZT) ist die Resistenzbildung bei Polysacchariden und deren Derivaten gering [DE CLERCQ, 1993, 1995, LÜSCHER-MATTLI, 2000, SCHAEFFER, 2000, WITVROUW, 1997, YANG, 2001].

Zunächst wurde untersucht, ob die eingesetzte Testkonzentration an Polysaccharid-Sulfat toxisch auf die Zellen wirkt. Nach Ausschluß der Zytotoxizität wurde der eigentliche antivirale Test durchgeführt.

Das Virus und die Testsubstanz wurden zusammen bei 37°C für 60min inkubiert. Nach Abtrennung der ungebundenen Inhibitoren (= Polysaccharide) wurden die MAGI-Zellen

mit den vorbehandelten Viren infiziert und für zwei Tage inkubiert. Ein Vergleich der vorbehandelten Zellproben mit der Kontrolle ergibt das Ausmaß einer antiviralen Wirkung.

Die sulfatierten Phyllanthus-Polysaccharide konnten die Replikation der HIV-1 Viruslinie im MAGI-Assay stark inhibieren. Der EC_{50} -Wert für das in DMSO sulfatierte Polysaccharid betrug $0,12 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ und für das in DMF sulfatierte Polysaccharid $0,27 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$.

Weiterhin wurde die Aufnahme des HIV-1 in die Zelle durch das in DMSO sulfatierte Polysaccharid dosisabhängig gehemmt. In einer Konzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ wurde die Internalisation des Virus um $82 \pm 7\%$, bei $0,5 \mu\text{g/ml}$ um $70 \pm 11\%$ und bei $0,125 \mu\text{g/ml}$ um $36 \pm 27\%$ gehemmt. Im Vergleich hemmte die Positivkontrolle (Heparin) die Virusaufnahme um $78 \pm 2\%$ in einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$.

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus wurde zusätzlich die Inhibierung der HIV-1 Virusreplikation untersucht. Das sulfatierte Polysaccharid war in einer Konzentration von $0,6 \mu\text{g/ml}$ in der Lage, die Virusreplikation während der Infektionsphase um fast 60% zu hemmen.

Diskussion der vorliegenden Ergebnisse der Phyllanthus-Polysaccharid-Sulfate zusammen mit Literaturergebnissen

Unter Berücksichtigung von Literaturergebnissen ergibt sich folgendes Gesamtbild: aus Algen und Pilzen konnten bisher sulfatierte Polysaccharide mit antiviraler Aktivität isoliert werden. Die Strukturen der isolierten Verbindungen sind sehr unterschiedlich; sie reichen von gering sulfatierten Homoglykanen bis hin zu hoch sulfatierten Heteropolysacchariden. In Tabelle 40 sind einige Literaturbeispiele zusammen mit ihren Anti-HIV-1-Aktivitäten angeführt:

Polysaccharide bzw. Pflanze	Strukturtyp	EC ₅₀ [µg/ml]	Literatur
Dextransulfat, 8kD	lineares sulfatiertes α-1,6-Glucan	0,024	YANG, 2001
Dextransulfat, 40kD	lineares sulfatiertes α-1,6-Glucan	1,3	LÜSCHER-MATTLI, 2001
Dextransulfat, 110kD	lineares sulfatiertes α-1,6-Glucan	3,0	LÜSCHER-MATTLI, 2001
Dextransulfat, 40kD	lineares sulfatiertes α-1,6-Glucan	1,3	LÜSCHER-MATTLI, 2001
sulf. Mannan, 20kD	sulfatiertes Mannan	1,6	LÜSCHER-MATTLI, 2001
Heparin	lineares sulfatiertes 1,4 Glucuronsäure-glucosamin	5	RIDER, 1997
λ-Carrageenan (<i>Chondrus crispus</i> , Rotalge)	lineares sulfatiertes 1,3-α-„Galaktan“	2,2	LÜSCHER-MATTLI, 2001
κ-Carrageenan (<i>Chondrus crispus</i> , Rotalge)	verzweigtes sulfatiertes 1,3-, 1,4-, 1,6-„Galaktan“	6,4	LÜSCHER-MATTLI, 2001
Curdlan	lineares sulfatiertes β-1,3-Glucan	3,3	YAMAMOTO, 1990
<i>Agardhiella tenera</i> (Rotalge)	sulfatiertes Galaktan	0,5	SCHAEFER, 2001
<i>Aspalathus linearis</i> (Rooibusch-Blätter)	saures Glucan (Rohfällung)	8-22	NAKANO, 1997
<i>Phyllanthus amarus</i>	sulfatiertes saures Arabinorhamnogalaktan (in DMSO)	0,12	diese Arbeit
	sulfatiertes saures Arabinorhamnogalaktan (in DMF)	0,27	diese Arbeit

Tabelle 40: Anti-HIV-1 Aktivität verschiedener Polysaccharide

Die Wirksamkeit der sulfatierten Polysaccharide korreliert mit dem Molekulargewicht und dem Sulfatierungsgrad: mit steigendem Molekulargewicht steigt tendenziell die Wirksamkeit etwas und mit steigendem Sulfatierungsgrad stark an.

Die sulfatierten Phyllanthus-Polysaccharide haben mit den EC_{50} -Werten von $0,12 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ für das in DMSO sulfatierte Polysaccharid und von $0,27 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ für das in DMF sulfatierte Polysaccharid eine vergleichsweise hohe Wirksamkeit. Deshalb wäre denkbar, daß der für die Wirksamkeit postulierte polyanionische Charakter sich additiv aus Sulfat- und Carboxylgruppen zusammensetzt.

Eine Ausnahme macht das von NAKANO et al. [1997] isolierte Polysaccharid, das stark wirksam ist, obwohl es als eines der wenigen bisher untersuchten Polysaccharide aus einer höheren Pflanze (Rooibusch-Blättern) keine Sulfatgruppen besitzt.

Die ersten durchgeführten *in vitro* Versuche ließen hoffen, eines Tages sulfatierte Polysaccharide als Therapeutika bei HIV oder anderen viralen Infektionen einsetzen zu können. Diese Hoffnungen haben sich allerdings bei Studien, die in den letzten Jahren an Tieren und Patienten durchgeführt wurden, nicht erfüllt.

Bei oraler Gabe von 0,9-5,4g Dextransulfat/Tag über 8 Wochen an HIV-Patienten konnte keine Veränderung der CD_4 -Lymphozytenanzahl und des HIV-Antigen-Levels festgestellt werden.

In einer weiteren Studie sollten HIV-Patienten für 14 Tage intravenös die maximale tolerierbare Dosis an Dextransulfat injiziert bekommen, doch bereits nach drei Tagen wurde eine reversible Thrombozytopenie diagnostiziert. Weiterhin wurde der HIV-Antigenspiegel signifikant erhöht, d.h. die kontinuierliche, intravenöse Gabe von Dextransulfat war toxisch und kontraproduktiv.

In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, daß Dextransulfat bei oraler Gabe systemisch aufgenommen wird. Mittels Elektrophoresetechnik konnte Dextransulfat sowohl im Serum als auch im Urin aller Probanden nachgewiesen werden. Jedoch fand nur eine geringe Resorption statt, die mit einem starken Abbau einherging. Die antivirale Aktivität von Dextransulfat wurde im Serum durch Degradation und vermutlich durch Einlagerung in der Niere stark reduziert.

Nach jetzigem Kenntnisstand sind daher sulfatierte Polysaccharide nicht als alleiniges Therapeutikum zum Einsatz gegen HIV geeignet. Jedoch waren einige in der Lage, AZT resistente HIV-1 Viren zu hemmen.

Ein neuer Therapieansatz wäre die Kombination von bereits bewährten antiviralen Therapeutika mit sulfatierten Polysacchariden. Damit würden die Vorteile beider Therapeutika kombiniert und es könnten somit auch Erkrankungen mit resistenten Virenstämmen behandelt werden [LÜSCHER-MATTLI, 2000, MATTHEE, 1999, RIDER, 1997, SCHAEFFER, 2000, WITRVRUW, 1997, YANG, 2001].

4. UNTERSUCHUNGEN VON POLYSACCHARIDEN AUF ANTIPHLOGISTISCHE WIRKUNG

Obwohl aus der Volksmedizin schon lange bekannt war, daß Pflanzenschleime, topisch oder oral appliziert, eine entzündungshemmende Wirkung besitzen, wurden erst in den letzten 10 Jahren pharmakologische Arbeiten publiziert, in denen diese Wirkungen anhand von Tiermodellen nachgewiesen werden konnten [z.B. FÜLLER, 2000, KRAUSS, 1998, PEREIRA, 2000, SENDL, 1993]. Die diesen Effekten zu Grunde liegenden Wirkmechanismen blieben aber in den meisten Fällen unbekannt. Auch Struktur-Wirkungs-Beziehungen konnten noch nicht aufgeklärt werden. Ebenfalls offen war die Frage, ob auch peroral oder intraperitoneal applizierte reine Polysaccharide oder solche, die in wässrigen Extrakten zusammen mit Glykoproteinen und anderen wasserlöslichen Verbindungen vorliegen, überhaupt systemische Wirksamkeit besitzen.

Wegen der komplexen Pathophysiologie der Entzündung ist es nicht leicht, die geeigneten *in vitro* und *in vivo* Modelle auszuwählen. Es gibt *in vitro* Modelle unter Einbeziehung der Arachidonsäurekaskade, des Komplement-Systems, der Histaminfreisetzung sowie Modelle von endokrinen und immunologischen Mechanismen, ohne daß genau bekannt wäre, welche Strukturtypen in die einen oder anderen Mechanismen eingreifen. Aus diesem Grund wird heute sehr häufig das Rattenpfotenödem-Modell als aussagekräftiges *in vivo* Modell bevorzugt, um schnell Aussagen über Wirksamkeit oder Unwirksamkeit eines derartigen Präparates machen zu können.

Über die verschiedenen Wirkmechanismen und die zur Verfügung stehenden Modelle existiert zahlreiche Literatur (z.B. THEWS, 1999, PAULSEN, 2000), so daß hier nicht erneut darauf eingegangen werden muß.

4.1. Polysaccharide mit antiphlogistischer Wirksamkeit

Bis zum Jahr 2000 sind über 70 Publikationen zum Thema „antiinflammatorische Wirkung von Polysacchariden“ erschienen. In der nachstehenden Tabelle sind einige strukturell unterschiedliche Polysaccharide und deren Ergebnisse in verschiedenen Testsystemen aufgelistet.

Pflanze	PS-Typ	MW [kD]	Test	Ergebnis	Literatur
<i>Achyrocline satureioides</i>	Glykanogalakturonan	15	RÖ	33% (3mg,i.v.,8h)	PUHLMANN, 1992
			K	93% (100µg/ml)	
			A	70% (100µg/ml)	
<i>Alisma orientale</i>	Galakturonan	52	K	35% (100µg/ml)	TOMODA, 1994
<i>Angelica acutiloba</i>	Polygalakturonan	32	K	53% (100µg/ml)	KIYOHARA, 1988
			A	4,8% (100µg/ml)	
<i>Artemisia princeps</i>	Rhamnogalakturonan	139	K	70% (100µg/ml)	YAMADA, 1986
<i>Bupleurum falcatum</i>	Arabinoglucan	19	K	25% (100µg/ml)	YAMADA, 1988
<i>Cnidium officinale</i>	Galaktan	51	K	55% (100µg/ml)	TOMODA, 1992
	Arabinogalaktan	79	K	53 (100µg/ml)	TOMODA, 1994b
<i>Dictyophora indusiata</i>	β-D-Glucan	33	RÖ	21% (25mg,2*i.p.,3h)	HARA, 1982
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Galakturonan	190	K	78,5% (33µg/ml)	ZHAO, 1991
<i>Malva verticillata</i>	Arabinogalaktan	26	K	60% (100µg/ml)	TOMODA, 1990
<i>Melia azadirachta</i>	Arabinoglucan	8	MÖ	37,8% (25mg,p.o.,5h)	FUJIWARA, 1984
<i>Paeonia lactiflora</i>	α-D-Glucan	112	K	30% (100µg/ml)	TOMODA, 1993
<i>Sedum telephinum</i>	Polygalakturonan	13	RÖ	25,1% (10mg,i.v.,3h)	SENDL, 1993
<i>Urtica dioica</i>	α-1,4-Glucan	10	RÖ	44% (10mg, i.p., 4h)	KRAUS, 1998

Tabelle 41: Literaturbeispiele über bisher isolierte strukturell unterschiedliche Polysaccharide mit antiinflammatorischer Wirksamkeit [KRAUS, 1998, ergänzt]
(RÖ = Hemmung im Rattenpfotenödem, MÖ = Hemmung im Mäusepfotenödem, K = Komplement klassisch, A = Komplement alternativ)

Wie die Tabelle 41 zeigt, gibt es sowohl neutrale als auch saure, sowohl heterogen als auch homogen strukturierte Polysaccharide mit nachgewiesener antiphlogistischer Wirkung. Sie entstammen den verschiedensten Pflanzenfamilien und besitzen Molekulargewichte von 4-500kD.

Die Wirkstärken ähneln sowohl bei *in vitro*- als auch bei *in vivo*-Modellen denen bekannter Referenzsubstanzen (Phenylbutazon oder Indometacin).

Wenn man die *in vivo*-Ergebnisse einer Bewertung zu Grunde legt, kommt man zu dem Schluß, daß Polysaccharide bei peroraler, intravenöser und intraperitonealer Gabe das Ödemvolumen signifikant senken und somit als antiphlogistische Therapeutika genutzt werden könnten.

4.2. Rattenpfotenödemtest der Phyllanthus-, Mucuna- und Cissus-Polysaccharide

Beim Rattenpfotenödemtest [OTTERNESS, 1988, WINTER, 1962] wird durch Injektion einer Carrageenanlösung in die Rattenhinterpfote eine Ödembildung provoziert. Eine Stunde vor der Provokation werden die Ratten intraperitoneal mit der Testlösung behandelt. Als Positivkontrolle dient das stark entzündungshemmende synthetische Präparat Indometacin (10mg/kg Körpergewicht); als Negativkontrolle wird eine physiologische Kochsalzlösung eingesetzt. Die Zunahme des Ödemvolumens in der Rattenpfote wird mit einem Plethysmometer über 24h gemessen.

Zur Berechnung werden die Meßwerte zuerst auf den Anfangswert normiert und anschließend die jeweiligen Stundenwerte gemittelt. Die Mittelwerte der Test- und Kontrollgruppen werden verglichen. Tabelle 42 zeigt die Ergebnisse, die für die eingesetzten Polysaccharide und die Positivkontrolle (Indometacin) bei intraperitonealer Applikation (10mg/kg Körpergewicht) erzielt wurden.

Testsubstanz (10mg/kg KG)	Volumen des Rattenpfotenödems [VE]			
	2h	4h	6h	24h
Kontrolle	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,2
Indometacin (Positivkontrolle)	0,3 ± 0,1 p=0,004	0,4 ± 0,1 p=0,030	0,3 ± 0,0 p=0,000	0,2 ± 0,0 p=0,022
genuines Phyllanthus- Polysaccharid	0,6 ± 0,0 p=0,059	0,9 ± 0,0 p=0,249	0,8 ± 0,1 p=0,077	0,3 ± 0,2 p=0,046
sulfatiertes Phyllanthus- Polysaccharid (DMF)	0,6 ± 0,2 p=0,102	0,7 ± 0,2 p=0,049	0,6 ± 0,2 p=0,044	0,3 ± 0,1 p=0,033
Mucuna-Polysaccharid	0,8 ± 0,2 p=0,245	0,9 ± 0,1 p=0,413	0,9 ± 0,1 p=0,500	0,5 ± 0,1 p=0,188
Cissus-Polysaccharid	0,9 ± 0,1 p=0,500	1,0 ± 0,1 p=0,582	0,9 ± 0,1 p=0,235	0,3 ± 0,1 p=0,040

Tabelle 42: Reduktion des Rattenpfotenödems bei intraperitonealer Applikation der Polysaccharide aus *Phyllanthus amarus* (genuin und sulfatiert), *Mucuna pruriens* und *Cissus quadrangularis*. Angegeben sind die Mittelwerte jeder Gruppe (n=4) ± Standardabweichung und die Fehlerwahrscheinlichkeit p (Student's tTest) [signifikant (**p<0,05**) oder hochsignifikant (**p<0,005**) zur Kontrollgruppe]

Wie zu erkennen ist, führt bei den genuinen Polysacchariden die intraperitoneale Applikation nach 2, 4 und 6h nur zu schwachen antiphlogistischen Effekten, die jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) sind. Nach 24h jedoch ist eine signifikante Hemmung ($p < 0,05$) bei allen Polysacchariden zu beobachten.

Das sulfatierte Phyllanthus-Polysaccharid hemmt schon nach 2h, jedoch nicht signifikant. Bei 4h und 6h ist der antiphlogistische Effekt im Gegensatz zu den genuinen Polysacchariden bereits signifikant. Interessanterweise nimmt die Hemmung durch alle eingesetzten Polysaccharide nach 24h zu, was auf eine Langzeitwirkung hindeutet, wie sie charakteristisch für Glucocorticoide ist.

Indometacin (Positivkontrolle) zeigte erwartungsgemäß einen signifikanten und teilweise hochsignifikanten ($p < 0,005$) antiphlogistischen Effekt (Abbildung 39).

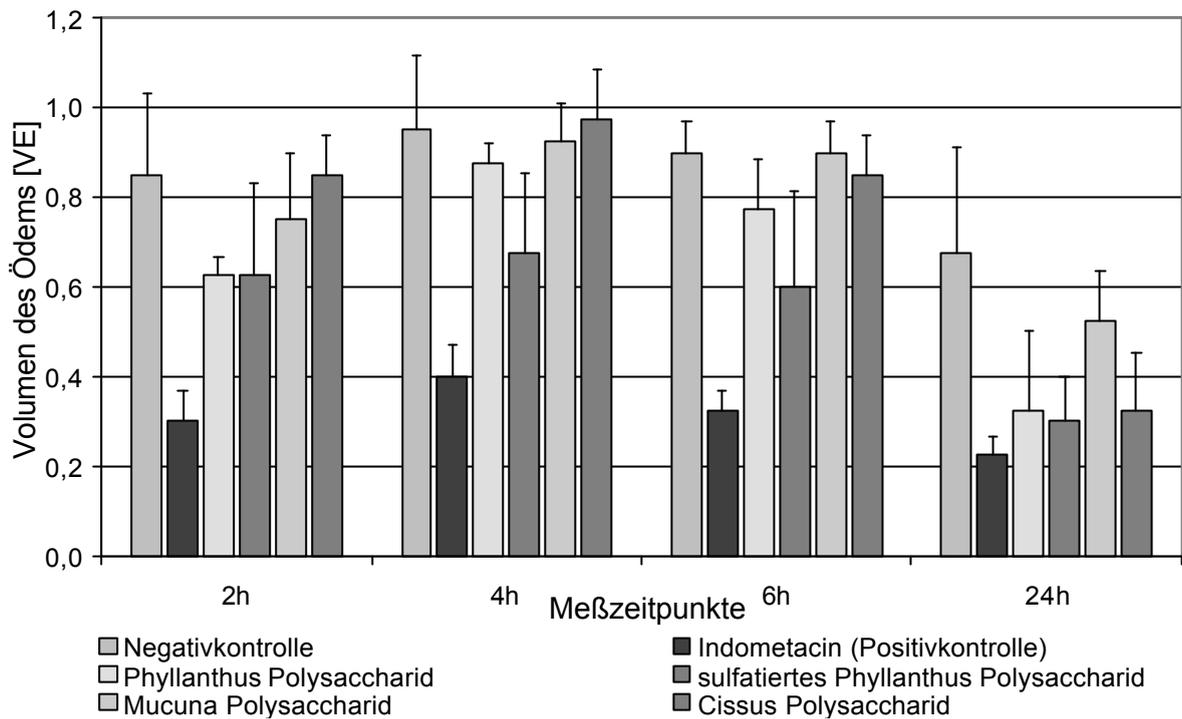


Abbildung 39: Hemmung des Rattenpfortenödems bei intraperitonealer Applikation der Polysaccharide aus *Phyllanthus amarus* (genuin und sulfatiert), *Mucuna pruriens* und *Cissus quadrangularis* bei einer Dosierung von 10mg/kg KG

Bei einer Dosierung von 10mg/kg KG zeigten sich geringe antiphlogistische Effekte. Da diese aber größtenteils statistisch nicht abgesichert sind, wurde eine zweite Versuchsreihe mit einer Dosierung von 20mg/kg KG durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 43 zusammengefasst.

Testsubstanz (20mg/kg KG)	Volumen des Rattenpfotenödems [VE]			
	2h	4h	6h	24h
Negativkontrolle	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,2
Indometacin* (Positivkontrolle)	0,3 ± 0,1 <u>p=0,004</u>	0,4 ± 0,1 <u>p=0,030</u>	0,3 ± 0,0 <u>p=0,000</u>	0,2 ± 0,0 <u>p=0,022</u>
genuines Phyllanthus- Polysaccharid	0,5 ± 0,1 <u>p=0,026</u>	0,7 ± 0,1 <u>p=0,062</u>	0,6 ± 0,0 <u>p=0,001</u>	0,1 ± 0,1 <u>p=0,009</u>
sulfatiertes Phyllanthus- Polysaccharid (DMF)	0,3 ± 0,0 <u>p=0,004</u>	0,4 ± 0,1 <u>p=0,003</u>	0,3 ± 0,1 <u>p=0,001</u>	0,2 ± 0,1 <u>p=0,014</u>
Mucuna-Polysaccharid	0,5 ± 0,1 <u>p=0,014</u>	0,6 ± 0,1 <u>p=0,014</u>	0,5 ± 0,1 <u>p=0,003</u>	0,1 ± 0,1 <u>p=0,009</u>
Cissus-Polysaccharid	0,4 ± 0,0 <u>p=0,007</u>	0,5 ± 0,0 <u>p=0,005</u>	0,4 ± 0,0 <u>p=0,000</u>	0,2 ± 0,1 <u>p=0,014</u>

Tabelle 43: Reduktion des Rattenpfotenödems bei intraperitonealer Applikation der Polysaccharide aus *Phyllanthus amarus* (genuin und sulfatiert), *Mucuna pruriens* und *Cissus quadrangularis*. Angegeben sind die Mittelwerte jeder Gruppe (n=3) ±Standardabweichung und die Fehlerwahrscheinlichkeit p (Student's tTest) [signifikant (**p<0,05**) oder hochsignifikant (**p<0,005**) zur Kontrollgruppe], *10mg/kg KG

Bei der intraperitonealen Gabe von 20mg/kg KG zeigten sich starke, statistisch signifikante Hemmungen ($p<0,05$, z.T. $p<0,005$). Interessanterweise weisen alle Polysaccharide - im Gegensatz zum 10mg/kg KG-Versuch - schon nach 2h und 4h einen deutlichen antiphlogistischen Effekt auf. Dieser Effekt nimmt mit Versuchsdauer zu und ist nach 24h stärker als der der Positivkontrolle (Indometacin). Auffällig ist, daß der Effekt des genuinen Phyllanthus- und Mucuna-Polysaccharids nach 6h noch nicht sehr ausgeprägt ist, aber nach 24h stärker ist als der der anderen Substanzen (incl. Positivkontrolle). Dieser Effekt ist in Abbildung 40 dargestellt.

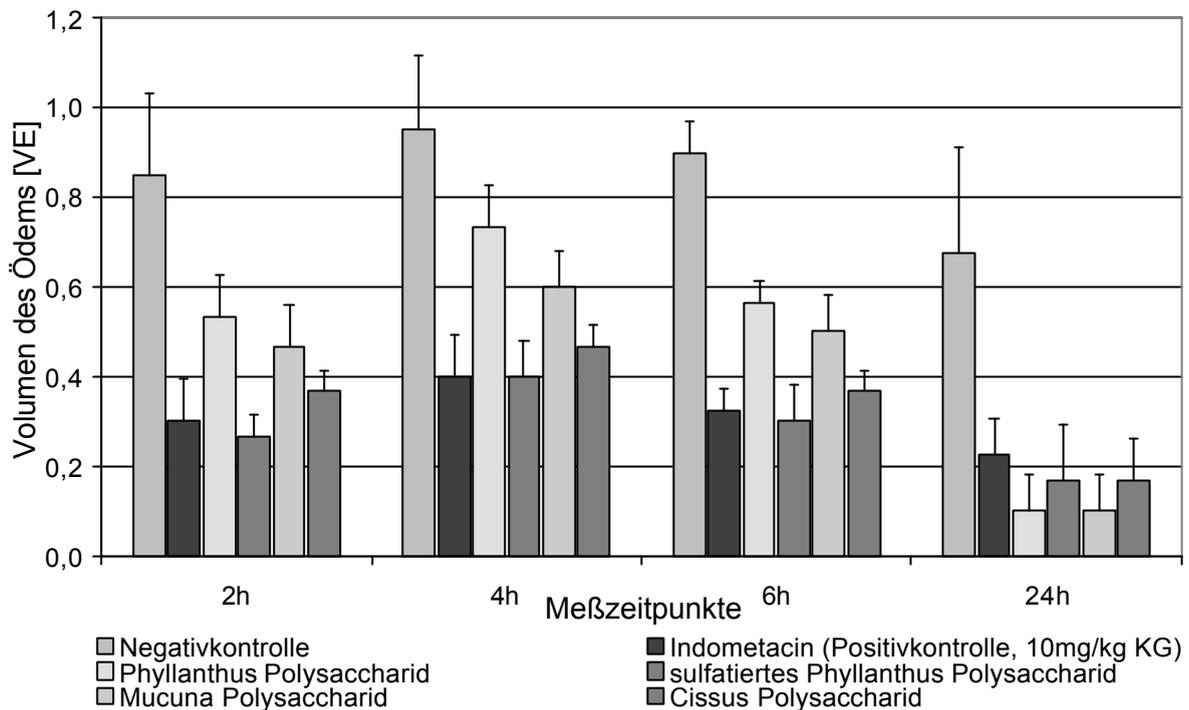


Abbildung 40: Hemmung des Rattenpfotenödems bei intraperitonealer Applikation der Polysaccharide aus *Phyllanthus amarus* (genuin und sulfatiert), *Mucuna pruriens* und *Cissus quadrangularis* bei einer Dosierung von 20mg/kg KG (Indometacin, c = 10mg/kg KG)

Beim Vergleich der beiden eingesetzten Konzentrationen fällt auf, daß die Hemmung bei 20mg/kg KG durch das sulfatierte Phyllanthus- und Cissus-Polysaccharid doppelt so hoch wie die Hemmung bei 10mg/kg KG ist. Bei dem genuinen Phyllanthus- und Mucuna Polysaccharid ist die Wirkung nach 2h und 4h bei beiden Konzentrationen ähnlich, nimmt aber mit zunehmender Versuchsdauer stark zu. Die Hemmung der 20mg/kg KG-Konzentration des Phyllanthus-Polysaccharids ist dreimal und die des Mucuna-Polysaccharids sogar fünfmal stärker als die bei 10mg/kg KG.

Nach 24h zeigen alle eingesetzten Polysaccharide eine stärkere signifikante - zum Teil hochsignifikante - Hemmung als die Positivkontrolle Indometacin.

Zusammenfassung

Bei den getesteten Polysacchariden handelte es sich um sehr unterschiedliche Strukturtypen:

- genuines Phyllanthus-Polysaccharid = saures Arabinorhamnogalaktan
- sulfatiert. Phyllanthus-Polysaccharid = saures sulfatiertes Arabino-
(in DMF sulfatiert) rhamnogalaktan
- genuines Mucuna Polysaccharid = saures Arabinoxyllogalaktan
- genuines Cissus-Polysaccharid = saures Arabinomannogalaktan

Die Wirksamkeit der genuinen Polysaccharide bei intraperitonealer Gabe ist in einer Konzentration von 10mg/kg KG nach 24h als sehr gut zu bezeichnen. Nach den Literaturangaben sind die Ödemhemmungen in der Maus oder Ratte meist nach 3-8h am stärksten. Die Wirksamkeitsverzögerung der eingesetzten Polysaccharide ist wahrscheinlich von den Molekulargewichten abhängig: mit steigendem Molekulargewicht verzögert sich der Wirkeintritt. Nach 24h haben die getesteten Polysaccharide ähnliche oder bessere Wirksamkeiten als die Kontrolle Indometacin. Bei Dosiserhöhung auf 20mg/kg KG waren bereits nach 2h deutliche Effekte zu erkennen. Durch die Konzentrationserhöhung scheint die intraperitoneale Aufnahme der Polysaccharide schneller vonstatten zu gehen, wodurch die Hemmung des Ödems schneller erzielt wird. Die Wirksamkeit der Polysaccharide steigt auch nach 24h im Vergleich zur Kontrolle an. Das sulfatierte Phyllanthus-Polysaccharid stellt eine Ausnahme dar, da es bereits nach 4h hochsignifikant die Ödembildung hemmt. Diese für Polysaccharide früh eintretende Wirkung ist wahrscheinlich auf den starken polyanionischen Charakter der Sulfatgruppen und auf das vergleichsweise geringe Molekulargewicht (M = 30kD) zurückzuführen; dadurch könnte es im Vergleich zu den anderen Substanzen schneller resorbiert werden.

GARBACKI et al. [2000] testeten verschiedene sulfatierte Polysaccharide aus Cyanobakterien im Crotonöl-induzierten Mäuseohrödem-Modell. Die Hauptkomponente, ein sulfatiertes Glucomannan, konnte die Ödembildung um bis zu 56% hemmen.

Resümee

Wenngleich die Zahl der getesteten Polysaccharide noch gering ist, kann man, da ihre Strukturen bekannt sind, beim Vergleich mit den Angaben der Literatur, folgende Aussagen treffen:

Bei Polysacchariden mit niedrigem Molekulargewicht tritt aufgrund der beschleunigten Resorption die Wirkung früher ein als bei solchen mit höherem Molekulargewicht. Hierfür sprechen zum einen der vergleichsweise frühe Wirkeintritt des sulfatierten Phyllanthus-Polysaccharids ($M = 30\text{kD}$) und zum anderen die verzögert eintretende Wirksamkeit des Phyllanthus- (259kD), Mucuna- (168kD) und Cissus- (272kD) Polysaccharids. Erst ein enzymatischer Abbau würde die aktiven Strukturen freisetzen, die dann zu der beobachteten antiphlogistischen Wirkung nach 24h führt.

Die Wirksamkeit von Polysacchariden wurde bisher sowohl *in vitro* (z.B. Komplementsystem) als auch *in vivo* (z.B. Rattenpfotenödem, i.p. und p.o.-Applikation) festgestellt. Jedoch können bis heute Wirkstrukturen und -schemata nur vermutet bzw. postuliert werden. So wird einerseits angenommen, daß sich die wirksamen Strukturelemente in der Feinstruktur (Sekundär- oder Tertiärstruktur) oder in „Untereinheiten“ der Gesamtstruktur verbergen. An dem gut untersuchten Arabinogalaktan aus der Lärche (*Larix occidentalis*), das ein Molekulargewicht von 37kD besitzt, konnte gezeigt werden, daß es sich aus vier gleichwertigen Untereinheiten von je 9kD zusammensetzt [PRESCOTT, 1995].

Vermutlich sind alle pflanzlichen Polysaccharide aus sich wiederholenden Untereinheiten aufgebaut, die dann als kleinere Bausteine ihre Wirksamkeit entfalten.

Die Primärstruktur hat wahrscheinlich keinen wesentlichen Einfluß auf die Wirksamkeit, da strukturell sehr unterschiedliche Polysaccharide antiphlogistisch wirksam sind (siehe Tabelle 41). Das Molekulargewicht scheint über Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur auch das Wirkprofil zu beeinflussen. Die Struktur-Wirkungs-Beziehung ist in den Sekundär- und Tertiärstrukturen sowie damit verbunden in den Molekulargewichten zu suchen.

Unsere Untersuchungen bestätigen weitgehend frühere Arbeiten und lassen den Schluß zu, daß die Wirksamkeit wässriger Pflanzenextrakte in pharmakologischen und klinischen Studien mit großer Sicherheit teilweise auf die enthaltenen Polysaccharide zurückzuführen ist, bzw. daß Polysaccharide die Wirkung anderer Inhaltsstoffe synergistisch oder additiv steigern.

Andere pharmakologische Ergebnisse (z.B. antidiabetische, antiinflammatorische Wirkung, etc.) konnten ebenfalls im Tiermodell nach Gabe von Polysacchariden oder wässrigen Extrakten beobachtet werden. Es sind somit auch beim Menschen mit großer Sicherheit pharmakologische Wirkungen durch Polysaccharide in hoher Dosierung zu erwarten.

Mögliche Wirkungsmechanismen

KRAUS [1998] konnte in seiner Arbeit zeigen, daß das von ihm isolierte neutrale Glucan aus *Urtica dioica* einen chemotaktischen Effekt besitzt: durch Extravasation der Leukozyten wird eine Leukopenie herbeigeführt, dadurch wird die Akkumulation der Leukozyten beim Carrageenan-induzierten Rattenpfotenödemtest reduziert und somit auch die Entzündung gehemmt.

Da die Wirkung der getesteten Polysaccharide mit zunehmender Versuchsdauer in dem verwendeten *in vivo*-Testsystem zunimmt, ist auch das Modell des „Counter-Irritation“-Effekts denkbar. Bei dem von DAMAS et al. [1986] beschriebenen Mechanismus wird durch lokale reflektorische Reize die Hypophyse zur Hormonproduktion stimuliert. Die gebildeten Hormone stimulieren die Nebenniere, deren ausgeschüttete Hormone bekanntermaßen antiphlogistisch wirken.

STENBERG et al. [1990] konnten zeigen, daß die Carrageenanprovokation bei Ratten eine Corticoid-Antwort zur Folge hatte. Bei weiteren Versuchen, bei denen die Corticoidbildung verhindert wurde (Entfernung der Hypophyse, Blockade der Corticoidsynthese), wurden signifikant erhöhte Ödemvolumina gemessen. Daraus folgt im Umkehrschluß, daß eine Abschwächung der entzündlichen Reaktion durch die Ausschüttung von Corticoiden erfolgt [BHATTACHARYA, 1987].

Es wäre denkbar, daß die getesteten Polysaccharide als Stressoren dieses endokrine System bereits vor der Provokation durch Carrageenan aktivieren und damit zu einer vermehrten Freisetzung von Corticoiden führen, wodurch letztendlich eine Verringerung des Ödemvolumens erzielt würde.

Jedoch ist die Wirkung der eingesetzten Polysaccharide stark dosisabhängig, wie bei der Ödembildung durch Carrageenan-Provokation beobachtet werden kann.

G ZUSAMMENFASSUNG

1. PHYTOCHEMIE

Phyllanthus amarus SCHUMACH. et THONN.

Aus dem Kraut von Phyllanthus amarus SCHUMACH. et THONN. wurde erstmals ein Hauptpolysaccharid durch Heißwasserextraktion, fraktionierte Ethanolfällungen und Chromatographie an DEAE-Sephrose isoliert.

Gemessen nach der HPGPC-Methode besitzt das saure Polysaccharid (Polysaccharid B) ein relatives Molekulargewicht von 425kD und eine optische Drehung von +133,6°; es enthält einen ca. 73%igen Uronsäureanteil und als Neutralzucker Rhamnose, Arabinose und Galaktose. Die Strukturaufklärung erfolgte durch Permethylierung, Abbau sowie MS- und NMR-Methoden. Die Hauptkette besteht demnach überwiegend aus 1,4-verknüpften pyranosidischen α -D-Galakturonsäure-Einheiten mit 1,2- und 1,2,4-verknüpften α -L-Rhamnopyranose- sowie 1,6- und 1,3,6-verzweigten β -D-Galaktopyranose-Einheiten. In den Seitenketten liegen sowohl 1,5-verzweigte α -L-Arabinofuranoseketten als auch hochverzweigte β -D-Galaktanketten (1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,3,6-, 1,3,4,6-verknüpft) neben Galakturonsäureketten vor. Der Galakturonsäureanteil ist zu 1,2% und die Hydroxylgruppen sind zu 2,2% verestert.

Das saure Arabinorhamnogalaktan ist ein Typ II-Polysaccharid (hochverzweigte galaktosehaltige Hauptkette).

Zur Umwandlung des nicht antiviral wirksamen Phyllanthus-Polysaccharides in ein aktives Polysaccharid-Sulfat wurde das Zuckerpolymer in DMF bzw. DMSO als Lösungsmittel durch Umsetzung mit dem SO_3^* Pyridin-Komplex sulfatiert. In beiden Versuchen führte das enthaltene Restwasser zu partiellem Abbau des Polysaccharides. Das in DMF sulfatierte Polysaccharid wies ein relatives Molekulargewicht von 30kD und das in DMSO sulfatierte von nur 3kD auf. Der Sulfatierungsgrad des Polysaccharid-Sulfats betrug 0,86 (DMSO) bzw. 0,95 (DMF), d.h. etwa jedes Zuckermonomer ist einfach sulfatiert.

Aus dem Methanolextrakt konnten zusätzlich Brevifolincarbonsäure ($M = 292,2\text{g/mol}$) sowie die Gallotannine Corilagin ($M = 634,5\text{g/mol}$) und Geraniin ($952,7\text{g/mol}$) isoliert und durch ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie identifiziert werden. Brevifolincarbonsäure wurde zum ersten Mal in *Phyllanthus amarus* nachgewiesen.

Die ermittelten antiviralen Aktivitäten (anti HIV-1) von Corilagin und Geraniin entsprechen den Konzentrationsbereichen, wie sie für strukturverwandte Ellagitannine in der Literatur beschrieben sind.

Mucuna pruriens L.

Aus den Samen von Mucuna pruriens L. wurde ein Hauptpolysaccharid durch Heißwasserextraktion, fraktionierte Ethanol-fällungen, Proteinabtrennung, Anionenaustausch- und Gelchromatographie isoliert. Die Strukturklärung erfolgte wieder durch Permethylierung, Abbau und Massenspektroskopie.

Das aus dem sauren Anteil der 1+1 Ethanol-fällung isolierte Polysaccharid besitzt ein relatives Molekulargewicht von 110kD und eine optischen Drehung von $+63,0^\circ$. Neben einem hohen Uronsäureanteil von 53,0% wurden die Neutralzucker Rhamnose, Xylose, Galaktose und Arabinose nachgewiesen. Die Hauptkette besteht nach dem Ergebnis der Permethylierung und der über Massenspektrometrie nachgewiesenen partiell methylierten Alditolacetate vorwiegend aus 1,4-verknüpften pyranosidischen α -D-Uronsäure-Einheiten (Glucuronsäure : Galakturonsäure = 1 : 70) mit 1,2-verzweigten β -D-Xylopyranose- und 1,2,4-verzweigten α -L-Rhamnopyranose- sowie 1,4- und 1,3,6-verzweigten β -D-Galaktopyranose-Einheiten. Die Seitenketten liegen sowohl als hochverzweigte α -L-Arabinoseketten (1,2-pyranosidisch, 1,2,5- und 1,3,5-furanosidisch verknüpft) als auch als 1,3,6-verzweigte β -D-Galaktanketten neben Galakturonsäureketten vor. In dem sauren Polysaccharid sind 2,0% der Hydroxylgruppen sowie 2,0% der Uronsäuren verestert.

Aufgrund des hochkomplexen Aufbaus des sauren Xyloarabinogalaktans kann das Polysaccharid dem Strukturtyp II zugeordnet werden.

Während der Entstehung der vorliegenden Arbeit erschienen Arbeiten von SINGH et al. [1999a, 1999b, 2000], in denen ein neutrales Galaktomannan aus *Mucuna pruriens*

beschrieben wird, das in der Struktur von dem von uns isolierten sauren Xyloarabinogalaktan abweicht. Die Unterschiede sind wahrscheinlich auf ein anderes Isolierungsschema und Pflanzenmaterial zurückzuführen.

Cissus quadrangularis L.

Durch Heißwasserextraktion, fraktionierte Ethanol-fällungen und Säulenchromatographie an DEAE-Sepharose wurde erstmals aus der Herba-Droge *Cissus quadrangularis* L. ein Hauptpolysaccharid isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte durch Permethylierung, Abbau sowie MS- und NMR-Messungen.

Das aus dem sauren Anteil der 1+1 Ethanol-fällung isolierte Polysaccharid besitzt nach der HPGPC-Methode ein relatives Molekulargewicht von 530kD und eine optische Drehung von +59,0°. Es besteht aus den Neutralzuckern Xylose, Arabinose, Mannose und Galaktose sowie einem Uronsäureanteil von 53,0%, der sich im Verhältnis 1:4 aus β -D-Glucuronsäure- und β -D-Galakturonsäure-Einheiten zusammensetzt. Die Hauptkette ist aus Uronsäuren zusammen mit hochverzweigten β -D-Mannopyranosid- (1,3-, 1,6- und 1,2,3-verknüpft) und β -D-Galaktopyranosid-Einheiten (1,4-, 1,3,6- und 1,3,4,6-verknüpft) aufgebaut. Als Seitenketten kommen sowohl hochverzweigte α -L-Arabinofuranoseketten (1,5-, 1,2,5-verknüpft) oder verzweigte Galaktanketten (1,4-, 1,3,6-verknüpft) sowie Galakturonsäureketten vor. In dem sauren Polysaccharid sind die Uronsäuren (0,9%) und die Hydroxylgruppen (0,2%) nur schwach verestert.

Das saure Xyloarabinomannogalaktan kann einem Typ II-Polysaccharid zugeordnet werden.

2. MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG

Bei dem Vergleich des bisher zur relativen Molekulargewichtsbestimmung eingesetzten HPGPC-Verfahrens mit der AF⁴-Methode wurden große Unterschiede festgestellt. Beide Verfahren erwiesen sich daher zur relativen Molekulargewichtsbestimmung von sauren hochpolymeren Heteropolysacchariden als ungeeignet.

Durch Kombination der AF⁴-Methode mit einem statischen Laserlichtstreuungsdetektor konnten die „absoluten“ Molekulargewichte der isolierten Polysaccharide mit relativ

großer Genauigkeit ermittelt werden, die erheblich von den relativen abwichen (siehe Tabelle 44).

Polysaccharide aus	Molekulargewicht [kD]		
	RI-Detektor ^a		SLS-RI-Detektor ^b
	AF ⁴	HPGPC	AF ⁴
<i>Phyllanthus amarus</i>	6	425	259
<i>Mucuna pruriens</i>	10	110	168
<i>Cissus quadrangularis</i>	6	530	272

Tabelle 44 Vergleich der Molekulargewichtsbestimmung durch AF⁴ und HPGPC bei verschiedenen Detektoren

^arelative und ^babsolute Molekulargewichtsbestimmung

Für das *Phyllanthus*-Polysaccharid wurde ein absolutes Molekulargewicht von 259kD, für das aus *Mucuna* von 168kD und für das aus *Cissus* von 272kD ermittelt.

3. PHARMAKOLOGIE

3.1. Immunmodulatorische Aktivität

Phagozytose

- Die durch 1+1- und 1+4-Ethanol-fällung erhaltenen Rohpolysaccharidgemische aus *Phyllanthus amarus* steigerten in der Konzentration von 10µg/ml die durchflußzytometrisch gemessene Phagozytoseaktivität gegenüber dem Mikroorganismus *Staphylococcus aureus* um 53% bzw. 52%. Das saure Arabinorhamnogalaktan erhöhte die Aktivität in der gleichen Konzentration um 46%.
- Das aus *Mucuna pruriens* isolierte Rohpolysaccharidgemisch aus der 1+1-Ethanol-fällung des Heißwasserextraktes aktivierte in einer Konzentration von 10µg/ml die Phagozytose um 21%.
- Das aus *Cissus quadrangularis* isolierte Rohpolysaccharidgemisch der 1+1-Ethanol-fällung stimulierte die Phagozytose-Aktivität in der Konzentration von 10µg/ml um 17% und das saure Xyloarabinomannogalaktan um 13%.

Da die Phagozytose-Aktivität mit steigendem Uronsäureanteil zunahm, scheint eine Struktur-Wirkungs-Beziehung zwischen Aktivität und saurem Zuckeranteil zu bestehen.

„oxidative burst“-Aktivität

- Die durch 1+1- und 1+4-Ethanol-fällung isolierten Rohpolysaccharidgemische aus Phyllanthus amarus steigerten im durchflußzytometrisch bestimmten Fluoreszenz-Test die „oxidative burst“-Aktivität in der Konzentration von 10µg/ml um 52% bzw. 32%. Das Hauptpolysaccharid erhöhte die Aktivität in der gleichen Konzentration um 62%.
- Das aus Mucuna pruriens isolierte Rohpolysaccharidgemisch aus der 1+1-Ethanol-fällung des Heißwasserextraktes aktivierte die „oxidative burst“-Aktivität in einer Konzentration von 10µg/ml um 29%.
- Das aus Cissus quadrangularis isolierte Rohpolysaccharidgemisch der 1+1-Ethanol-fällung und das Hauptpolysaccharid steigerten die „oxidative burst“-Aktivität in der Konzentration von 10µg/ml um 26% bzw. um 24%.

Auch die „oxidative burst“-Aktivität scheint sich mit steigendem Uronsäureanteil zu erhöhen. Für die Struktur-Wirkungs-Beziehung spielen vermutlich auch noch andere Faktoren wie der Verzweigungsgrad oder die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur eine Rolle.

3.2. Antivirale Aktivität

Die aus Phyllanthus, Mucuna und Cissus isolierten Polysaccharide waren bei fehlender zytotoxischer Wirkung (in Konzentrationen von 5-500µg/ml gegenüber Leberzellen) nicht in der Lage, in Konzentrationen von 1-50µg/ml die *de novo* Synthese des *wild type* Hepatitis B Virus signifikant zu hemmen.

Die in DMF bzw. DMSO sulfatierten Phyllanthus-Polysaccharide waren in Konzentrationen von 1-100µg/ml in MT4 Zellen *nicht* zytotoxisch. Sie erwiesen sich im MAGI-Assay als starke Inhibitoren der Virusreplikation (HIV-1). Der EC₅₀-Wert für das in DMSO sulfatierte Polysaccharid betrug $0,12 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$ und für das in DMF sulfatierte Polysaccharid $0,27 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$.

Das in DMSO sulfatierte Phyllanthus-Polysaccharid konnte dosisabhängig die HIV-1 Internalisation im MAGI-Test inhibieren. In einer Konzentration von 2µg/ml wurde die Internalisation des Virus um 82±7%, bei 0,5µg/ml um 70±11% und bei 0,125µg/ml um 36±27% gehemmt (Positivkontrolle mit Heparin: Inhibierung der Virusaufnahme um 78±2% in einer Konzentration von 100µg/ml). Ferner konnte das sulfatierte Polysaccharid die HIV-1 Replikation während der Infektionsphase um ca. 60% hemmen.

Der Vergleich mit Literaturdaten ließ eine tendenzielle Struktur-Wirkungs-Beziehung erkennen, d.h. mit steigendem Molekulargewicht erhöhte sich die Wirksamkeit geringfügig, mit steigendem Sulfatierungsgrad jedoch stark. Offenbar spielt der sich additiv aus Sulfat- und Carboxylgruppen zusammensetzende polyanionische Charakter für den Wirkungsgrad eine wichtige Rolle.

3.3. Antiphlogistische Aktivität

Die aus Phyllanthus, Mucuna und Cissus neu isolierten Polysaccharide sowie das sulfatierte Phyllanthus-Polysaccharid zeigten im Rattenpfotenödem bei intraperitonealer Applikation eine starke antiphlogistische Wirksamkeit. In Tabelle 45 sind die Ergebnisse der Hemmungen des Rattenpfotenödems zusammengefaßt:

Testsubstanz	Hemmung des Rattenpfotenödems nach 24h [%]	
	10mg/kg KG	20mg/kg KG
genuines Phyllanthus-Polysaccharid	57	86
sulfatiertes Phyllanthus-Polysaccharid (DMF)	57	71
genuines Mucuna-Polysaccharid	29	86
genuines Cissus-Polysaccharid	57	71

Tabelle 45: Reduktion des Rattenpfotenödems bei intraperitonealer Applikation nach 24h (Mittelwerte)

Bei den genuinen Polysacchariden nahm die Wirksamkeit zeitabhängig zu, wobei das sulfatierte Phyllanthus-Polysaccharid mit kleinem Molekulargewicht in beiden Konzentrationen bereits nach 2h eine Hemmung bewirkte.

Eine Struktur-Wirkungs-Beziehung konnte demnach in Abhängigkeit des Molekulargewichts festgestellt werden: je kleiner das Molekulargewicht des Polysaccharids ist, umso früher tritt offenbar aufgrund der schnelleren Resorption die Wirkung ein.

Vermutlich sind Untereinheiten, die nach enzymatischer Degradation erhalten werden, für die starke Wirksamkeit der Polysaccharide mit großem Molekulargewicht verantwortlich.

Die Ergebnisse der phytochemischen und pharmakologischen Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen frühere Vorstellungen über die Beteiligung von Inhaltsstoffen rein wässriger Pflanzenextrakte der traditionellen Medizin an einer therapeutischen Wirksamkeit.

Neben den wasserlöslichen Tanninen zeichnen sich vor allem die hochmolekularen sauren Polysaccharide durch eine Reihe pharmakologischer Wirkungen aus.

Die in dieser Arbeit beschriebene bereits in relativ niedriger Dosierung zum Tragen kommende immunstimulierende, antiphlogistische sowie antidiabetische Wirksamkeit (letztere aus patentrechtlichen Gründen hier nicht aufgeführt) eröffnen die Möglichkeit, in Zukunft auch isolierte Reinstoffe aus diesen Verbindungsklassen zur Arzneimittelentwicklung zu verwenden.

H MATERIAL UND METHODEN

1. DROGEN-/ POLYSACCHARIDHERKUNFT

<i>Phyllanthus amarus</i> :	Herba-Material aus Indien (über Fa. LAT bezogen, Martinsried; Chargennummern: B. No. PA-05 und B. No. PA-08,)
<i>Cissus quadrangularis</i> :	getrocknetes oberirdisches Material aus Indien (Fa. Zhandu, Indien, Chargenbezeichnung: HADJOD B und F)
<i>Mucuna pruriens</i> :	getrocknete gemahlene Bohnen aus Indien (über Fa. LAT bezogen, Martinsried; Chargennummer: B.No: ZP / RK / 003 / 99)

2. PHYSIKALISCH-CHEMISCHE ARBEITSMETHODEN

2.1. Analytische Dünnschichtchromatographie

Stationäre Phase:

Kieselgel-Fertigplatten 60 F₂₅₄ (20 × 20cm, Schichtdicke 0,25mm, Fa. Merck, Darmstadt)

Mobile Phase:

- Laufmittel 1: Chloroform-Methanol-Wasser (64:40:8)
- Laufmittel 2: Butanol-Aceton-Eisessig-Wasser (35:35:10:20)
- Laufmittel 3: Ethylformiat-Ameisensäure-Wasser (80:10:10)

Detektionsmittel:

Nach dem Trocknen wurden die DC-Platten zuerst im Tageslicht (*vis*) ausgewertet, dann im UV_{254nm} und UV_{365nm} betrachtet. Anschließend wurde mit einem der folgenden Reagenzien detektiert.

Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure-Reagenz

2ml Anilin, 2g Diphenylamin und 10ml Phosphorsäure (85%) wurden gemischt und mit Methanol auf 100ml aufgefüllt. Nach Besprühen wurde im Trockenschrank 10min bei 100°C erhitzt und im *vis* ausgewertet.

Anwendung: Nachweis von Zuckern

Eisen(III)chlorid-Reagenz

10% FeCl₃·6H₂O Lösung (m/V) in demineralisiertem Wasser.

Nach mehrmaligem Besprühen und Zwischentrocknen wurde im *vis* ausgewertet.

Anwendung: Nachweis von Gallotanninen

2.2. HPLC

Probenvorbereitung

Nach dem Lösen wurden die Proben zentrifugiert (5min, 3500UpM), 1,0ml des Überstands auf eine mit 6ml Methanol konditionierte SEP-PAK C 18-Kartusche (Fa. Waters, Eschborn) aufgegeben und mit weiteren 6ml Methanol eluiert.

Das Eluat wurde zur Trockne eingengt, in 1,0ml Methanol aufgenommen, 10min bei 10000UpM zentrifugiert und der Überstand durch einen 0,45µm PVDF-Filter (Fa. Alltech, Kronberg-Oberhöchstadt) filtriert. Die klare Lösung wurde für die HPLC eingesetzt.

Parameter

Apparat:	HP 1090 (Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn)
Detektor:	DAD HP 1040 (Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn)
Säule:	LiChrospher 100 RP 18 (5 µm; 125 x 4 mm) (Fa. Merck, Darmstadt)
Vorsäule:	LiChrospher 100 RP 18 (5 µm; 4 x 4 mm) (Fa. Merck, Darmstadt)
Fließmittel:	<u>Fließmittel A:</u> 2,0ml 1N o-H ₃ PO ₄ in 1000ml Wasser LiChrosolv (Fa. Merck, Darmstadt), pH 2,9 <u>Fließmittel B:</u> Acetonitril HPLC Grade (Fa. Promochem, Wesel)
Gradient:	5-15% B in 20min 15-25% B in 15min; 25-50% B in 5min; 50-90% B in 20min
Gesamtlaufzeit:	60min
Postrun:	10min
Flußrate:	1,0ml/min
Injektionsvolumen:	10µl
Konzentration:	1%ige Lösungen (m/V) in Methanol LiChrosolv (Fa. Merck, Darmstadt)
Detektion:	254 nm; 280 nm; 365 nm (200 nm)

2.3. Trennung an Sephadex LH 20

Säulen (Fa. Pharmacia, Freiburg)

<i>Kleine Säule:</i>	Durchmesser 10mm, Gelbetthöhe 30cm Flußrate: 6ml/h aufgetragene Substanzmenge: 200mg Gallotanninfraktion
<i>Große Säule:</i>	Durchmesser 25mm, Gelbetthöhe 35cm Flußrate: 30ml/h aufgetragene Substanzmenge: 1000mg Gallotanninfraktion
Elutionsmittel:	20%, 50% und 80% wässriges Methanol (V/V)
Detektor:	Uvicord S II (Fa. LKB, Bromma, Schweden)
Fraktionssammler:	Ultrorac II 2070 (Fa. LKB, Bromma, Schweden)
Pumpe:	LKB 2132 Microperpex - peristaltic pump (Fa. LKB, Bromma, Schweden)

Durchführung

Die Probe wurde in wenig Eluens gelöst und auf die Sephadex-Säule aufgetragen, mit dem jeweiligen Lösungsmittel eluiert und die Fraktionen im Fraktionssammler aufgefangen. Die Detektion der einzelnen Fraktionen erfolgte online mittels UV-Detektor. Nach Vereinigung zusammengehörender Fraktionen wurde Methanol unter Vakuum abrotiert. Das Lyophilisat des Rückstands ergab die Reinsubstanz.

2.4. Dialyse

Material:	Servapor-Dialyseschläuche, Porenweite ca. 12-14kD, (Fa. Serva, Heidelberg)
Art und Dauer:	a) stehend (im 10l Eimer) unter Rühren gegen demineralisiertes Wasser Dauer: mind. 3 Tage, mit 4 Wasserwechseln pro Tag b) fließend unter Rühren gegen demineralisiertes Wasser Dauer: mind. 72h

2.5. Zentrifugation

Geräte:	Biofuge 13, Megafuge 1.0 S, Variofuge 20 RS und Suprafuge 22 (alle Fa. Heraeus Christ, Osterode)
---------	--

2.6. Lyophilisation

Geräte: Modulyo (Fa. Edwards, Kirchheim), mit VacUUbrand RD-8
Pumpe (Fa. Vacuubrand, Wertheim)
Gamma 1-20 (Fa. Heraeus Christ, Osterode)
Epsilon 2-12D (Fa. Heraeus Christ, Osterode, *im AK Prof. Winter, Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung, LMU-München*)

2.7. Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden von der Mikroanalytischen Abteilung des Department Chemie - Organische Chemie, LMU-München, angefertigt.

2.8. ^1H - und ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie

Gerät: Kernresonanzspektrometer GSX 400N (400MHz) (Fa. Jeol, Eching)
Lösungsmittel: D_2O , CD_3OD , CDCl_3 , D_6 -Aceton, D_6 -DMSO (Fa. Sigma, Taufkirchen)
Einwaage: 20-30mg auf 0,7ml D_2O

Die Signalverschiebungen wird in ppm angegeben.

Die Messungen wurden von Herrn Dr. Lerche und seinen Mitarbeitern, Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung, LMU-München, durchgeführt.

2.9. Bestimmung der optischen Drehung

Gerät: Perkin-Elmer Polarimeter 241 (Fa. Perkin-Elmer, Überlingen)
Küvette: Volumen: 1ml, Länge: 1dm
Wellenlänge: 589nm (Na-Lampe)
Zur Detektion der Polysaccharidfraktionen wurde bei 365nm (Hg-Lampe) gemessen.
Konzentration: 0,1% (m/V)
Lösungsmittel: destilliertes Wasser

Durchführung

Die auf $20\pm 0,5^\circ\text{C}$ eingestellten wässrigen Lösungen der Polysaccharide wurden fünfmal hintereinander gemessen und der Mittelwert α gebildet. Die spezifische Drehung $[\mathbf{a}]_D^{20}$ wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$[\mathbf{a}]_D^{20} = \frac{100 \cdot \mathbf{a}}{l \cdot c}$$

α = Drehwinkel, in Grad bei $20\pm 0,5^\circ\text{C}$

l = Länge der Küvette in Dezimeter

c = Konzentration der Substanz in Prozent (m/V)

Polarimeter-Detektion

Gerät/Küvette: siehe oben

Wellenlänge: 365nm (Hg-Lampe)

2.10. Bestimmung des Wassergehalts

Karl-Fischer-Titration: 737 KF Coulometer (Fa. Metrohm AG, Herisau, Schweiz),

Lösungsmittel: Hydranal[®]-Titrant, Hydranal[®]-Solvent, Methanol_{wasserfrei}
(Fa. Riedel de Haën, Seelze)

Zentrifuge: Christ (Fa. Heraeus Christ, Osterode)

Durchführung

Die Probenfläschchen mit Lyophilisat wurden gewogen und mit etwa 2ml wasserfreiem Methanol versetzt und erneut gewogen. Die Proben wurden 10min ins Ultraschallbad gestellt und anschließend zentrifugiert. Etwa 300 μ l wurden mit einer Mikroliterspritze aufgezogen, diese gewogen, der Inhalt in das Titriergefäß eingespritzt und die Spritze erneut gewogen. Der errechnete Wassergehalt wurde am Gerät abgelesen und rechnerisch, unter Berücksichtigung des Lösungsmittelwassergehalts und dem Lyophilisat-trockengewicht, der relative Wassergehalt des Lyophilisats ermittelt. Durch fünfmaliges Einspritzen eines Wasserstandards wurde die Reproduzierbarkeit überprüft. Der Wasserwert des Lösungsmittels und der Proben wurde ebenfalls aus dem Mittelwert von fünf Einspritzungen bestimmt.

Die Messungen konnten an den Geräten des Arbeitskreises von Prof. Winter, Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung, LMU-München, durchgeführt werden.

2.11. Molekulargewichtsbestimmung

2.11.1. High Performance Gel Permeation Chromatography (HPGPC)

Vorsäule:	selbstgepackte Säule mit I-125 Proteinmaterial gefüllt, l = 5cm
Säule:	Superose 12 (Fa. Pharmacia, Freiburg) bzw. Sepharose 6B (Fa. Sigma, Taufkirchen)
Mobile Phase:	PBS-Puffer (0,05M Na-Phosphatpuffer pH = 7,0 mit 0,1M NaCl)
Einspritzmenge:	100µl einer 2%igen Lösung (m/V) in PBS-Puffer
Laufzeit:	50min
Durchfluß:	0,45ml/min
Interface:	D-6000, Softwaresteuerung (Fa. Merck, Darmstadt)
Autosampler:	AS-2000 (Fa. Merck, Darmstadt)
Pumpe:	L-6200 (Fa. Merck, Darmstadt)
Detektor:	DAD-Detektor L-4500 (Fa. Merck, Darmstadt) Differentialrefraktometer R-401 (Fa. Waters, Eschborn)

Eichsubstanzen:	Glucose (Fa. Merck, Darmstadt)
	Dextran: 5, 15, 40, 70, 110, 500 und 2000kD (alle Fa. Pharmacia, Freiburg)
	Pullulan: 5,6, 11,2, 22,0, 45,9, 106, 200, 380, 710, 1520kD (alle Fa. Postnova, Eresing)
	Lärchenarabinogalaktan: Fa. Sigma, Taufkirchen

Auswertung:

$$K_D = \frac{V_E - V_0}{V_T - V_0}$$

Anhand der Retentionszeiten jeder Eichsubstanz wurde das zugehörige Elutionsvolumen V_E bestimmt. Nach der Formel konnte der K_D -Wert der Probe in Abhängigkeit von Total- (V_T) und Ausschlußvolumen (V_0) der Superose-12-Säule berechnet werden. Aus den K_D -Werten der Eichsubstanzen, logarithmisch aufgetragen gegen ihre Molekulargewichte, ergibt sich eine Eichgerade, aus der sich im linearen Bereich das Molekulargewicht der Probe anhand des zugehörigen K_D -Wertes ablesen läßt.

2.11.2. Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung (AF⁴)

Parameter der Messung mit RI-Detektor

Anlage:	Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung HRFFF 10.000, incl. Pumpen, AF ⁴ -Modul, Kanal, Software (Fa. Postnova, Eresing)	
Entgaser:	PN 7505 (Fa. Postnova, Eresing)	
Autosampler:	Thriathlon (Spark Holland, VE Emmen, Niederlande)	
RI-Detektor:	Differential-Refraktometer R401 (Fa. Waters, Eschborn)	
Spritzenpumpe:	LKB P-500 (Fa. Pharmacia, Freiburg)	
Membrantyp:	regenerierte Zellulose (cut off = 5kD)	
Konzentration:	2,0mg/ml	
Probenvolumen:	100µl	
Eluent:	Reinstwasser	
Eichsubstanzen:	siehe 2.11.1	

Meßmethode:	Meßzeit:	20min
	Querflußgradient:	85-10% linear in 20min
	Laminarfluß out:	0,5ml/min von 0-20min
	Laminarfluß in:	1,67-1,0ml/min von 0-20min
	Injektionszeit:	60s
	Fokussierzeit:	240s

Die Messungen wurden im Arbeitskreis von Prof. R. Nießner, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, TU-München, durchgeführt.

Parameter der Messung mit SLS- und RI-Detektor

Anlage:	Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung HRFFF 10.000, incl. Pumpen, AF ⁴ -Modul, Kanal, Software (Fa. Postnova, Eresing)	
Entgaser:	PN 7505 (Fa. Postnova, Eresing)	
Autosampler:	PN 5200 (Fa. Postnova, Eresing)	
RI-Detektor:	PN 1000 (Fa. Postnova, Eresing)	
Multilaserdetektor:	SLS/DLS PN 3000 (Fa. Postnova, Eresing)	
Membrantyp:	regenerierte Zellulose (cut off = 5kD), Spacer d = 0,35mm	
Konzentration:	2,0mg/ml	
Probenvolumen:	100µl	
Eluent:	0,2M Natriumnitratlösung in Reinstwasser	

Meßmethode:	Meßzeit:	20min
	Querflußgradient:	40-0% linear in 20min
	Laminarfluß out:	1,0ml/min von 0-20min
	Laminarfluß in:	1,67-1,0ml/min von 0-20min
	Injektionszeit:	60s
	Fokussierzeit:	120s

Die Messungen wurden in der Fa. Postnova, Eresing, durchgeführt.

2.12. Proteingehalt nach LOWRY [1951]

Reagenzien:	alkalisches Kupferreagenz: 1ml 1%ige wässrige CuSO ₄ -Lösung (m/V) 1ml 2%ige wässrige K-Na-Tartrat-Lösung (m/V) 20ml 10% Na ₂ CO ₃ in 0,5M NaOH (m/V)
	Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz (Fa. Merck, Darmstadt): 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt
	Standardlösungen: Rinderserumalbumin (Fa. Sigma, Taufkirchen) in Konzentrationen von 5-300µg/ml in destilliertem Wasser
	Probenlösungen: 0,1% (m/V) in destilliertem Wasser
	Blindlösungen: destilliertes Wasser

Durchführung

1ml Proben-, Standard- bzw. Blindlösung wurden mit je 1ml alkalischem Kupferreagenz versetzt. Nach 15min bei Raumtemperatur wurden je 3ml Folin-Reagenz zugegeben und sofort kräftig durchmischt. Nach 45min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 540nm gegen den Blindwert gemessen. Anhand der Eichgerade konnte der Proteingehalt der Probe bestimmt werden.

2.13. Uronsäurebestimmung nach BLUMENKRANTZ [1973]

Reagenzien: Dinatriumtetraborat-Reagenz (Fa. Merck, Darmstadt):
0,5% (m/V) in H₂SO₄_{konz.} (Wärme, Ultraschallbad)

Hydroxybiphenyl-Reagenz (Fa. Sigma, Taufkirchen):
0,15% (m/V) in 1M NaOH

Standardlösungen:
Galakturonsäure (Fa. Fluka, Steinheim) in Konzentrationen
von 10-200µg/ml in demineralisiertem Wasser

Probenlösungen: 0,05% (m/V) in destilliertem Wasser

Blindlösung: destilliertes Wasser

Durchführung

800µl Proben-, Standard- bzw. Blindlösung wurden mit 4ml des Dinatriumtetraborat-Reagenz versetzt, sorgfältig gemischt und 5min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur im Wasserbad wurde die Absorption bei 520nm gemessen (=Meßwert 1). Anschließend wurden 80µl des Hydroxybiphenyl-Reagenz zugegeben, geschüttelt und 5min bei Raumtemperatur stehengelassen. Durch Messung der Absorption bei 520nm erhielt man den Meßwert 2. Die Differenz (Meßwert 2 – Meßwert 1) war maßgeblich für die Bestimmung. Aus der Eichgerade der Galakturonstandards ergab sich der jeweilige Uronsäureanteil.

2.14. Dünnschichtchromatographie (Monosaccharide bzw. Polysaccharide nach Hydrolyse)

Adsorbentien: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten 20 x 20cm (Fa. Merck, Darmstadt)

mobile Phase: Chloroform : Methanol : Wasser (64:14:8)
Butanol : Aceton : Eisessig : Wasser (35:35:10:20)

Detektion: Anilindiphenylaminphosphorsäure (2ml Anilin, 2g Diphenylamin, 10ml Phosphorsäure ad 100ml Methanol)
Farbreaktion im *vis* nach 10min, 100°C (Trockenschrank)

Durchführung

1-2mg Polysaccharid wurden in einer 25ml Glasampulle eingewogen und mit 1-2ml 2M Trifluoressigsäure versetzt. Nach dem Verbördeln der Ampulle wurde die Probe 90min bei 121°C im Trockenschrank hydrolisiert. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung direkt auf die Kieselgelplatte aufgetragen. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich mit Monosacchariden als Referenzsubstanzen.

2.15. Neutralzuckeranalyse der Alditolacetate

2.15.1. Darstellung der Alditolacetate nach BLAKENEY [1983]

Geräte/Material:	25ml Glasampullen Trockenschrank Wasserbad Rotationsverdampfer
Reagenzien:	Zuckerstandards (Rhamnose, Fucose, Arabinose, Xylose, Mannose, Galaktose, Glucose (Fa. Merck, Darmstadt)) 2M Trifluoressigsäure myo-Inositol (Fa. Sigma, Taufkirchen) Eisessig Acetanhydrid Methanol p.A. (Fa. Merck, Darmstadt) 1-Methylimidazol (Fa. Sigma, Taufkirchen) Acetanhydrid p.A. (Fa. Sigma, Taufkirchen) 1M Ammoniak NaBH ₄ (Fa. Merck, Darmstadt) 2% (m/V) in trockenem DMSO frisch gelöst Dichlormethan p.A. (Fa. Merck, Darmstadt)

Durchführung

1-2mg Polysaccharid bzw. 1mg jedes Monosaccharids der Standardmischung (Rhamnose, Fucose, Arabinose, Xylose, Mannose, Galaktose und Glucose) wurden in 25ml Glasampullen eingewogen und mit 2ml 2M Trifluoressigsäure versetzt. Nach Verschluss der Ampullen wurden die Lösungen 90min bei 121°C im Trockenschrank erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 200µl Inositstandardlösung (c = 5mg/ml) zugegeben und die Hydrolysate in 25ml Spitzkolben überführt, unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt, zweimal mit je 2ml Methanol aufgenommen und abermals einrotiert. Die Rückstände wurden in 0,1ml 1M Ammoniak aufgenommen und durch Zugabe von 1ml NaBH₄-Lösung (2% (m/V) in DMSO) 90min im Was-

serbad bei 40°C reduziert. 0,4ml anschließend zupipettierter Eisessig zerstörte überschüssiges NaBH₄. Die Acetylierung des reduzierten Zuckergemisches erfolgte 15min später durch Zusatz von 2ml Acetanhydrid und 0,2ml 1-Methylimidazol als Katalysator. Nach 15min wurde überschüssiges Acetanhydrid mit 20ml eiskaltem Wasser zerstört; weitere 15min später wurden die Alditolacetate mit 0,7ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Unterphase wurde direkt zur gaschromatographischen Analyse verwendet.

2.15.2. Gaschromatographie – Trennung der Alditolacetate (quantitative Neutralzuckeranalyse)

Gerät:	Perkin-Elmer Autosystem XL, Turbochrom-Software (Fa. Perkin Elmer, Überlingen)
Trägergas:	Helium
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), 260°C
Einspritzmenge:	1µl, 260°C
Säule:	SP-2380 (Fa. Supelco, Taufkirchen), 30m×0,25mm×0,2µm Filmdicke (90%-Biscyanopropyl-10%-cyanopropylphenylsiloxan)
Temperatur:	Injektor: 260°C
	Gradient: 210°C, 5min 5°C/min auf 235°C, 1°C/min auf 245°C, 10°C/min auf 260°C

2.16. **Methylierungsanalyse der Polysaccharide nach HARRIS [1984]**

Geräte/Material:	Exsikkator 25ml Glasampullen Trockenschrank Wasserbad Rotationsverdampfer Zentrifuge
Reagenzien:	DMSO wasserfrei (Molekularsieb 4 Å, Fa. Sigma, Taufkirchen) Kaliumhydrid (ölige Suspension, Fa. Sigma, Taufkirchen) Methyliodid (Fa. Sigma, Taufkirchen) Chloroform, p.A. (Fa. Merck, Darmstadt) Methanol, p.A. (Fa. Merck, Darmstadt) destilliertes Wasser 2,2-Dimethoxypropan

Eisessig
2M Trifluoressigsäure
Natriumborhydrid bzw. Natriumbordeuterid (Fa. Sigma, Taufkirchen)
2M Ammoniak
Aceton, p.A. (Fa. Merck, Darmstadt)
Ethylacetat, p.A. (Fa. Merck, Darmstadt)
Acetanhydrid (Fa. Merck, Darmstadt)
60% Perchlorsäure (Fa. Merck, Darmstadt)
1-Methylimidazol (Fa. Sigma, Taufkirchen)
Dichlormethan, p.A. (Fa. Merck, Darmstadt)
myo-Inositolhexaacetat (Fa. Sigma, Taufkirchen)

Probenvorbereitung

1-5mg der mindestens 16h im Vakuum über Phosphorpentoxid getrockneten Proben wurden in 25ml Ampullen in 200µl wasserfreiem DMSO (Molekularsieb 4 Å) gelöst. Die Ampullen wurden nach Begasen mit Argon zugebördelt.

Der Lösevorgang kann durch Erwärmen und Rühren unterstützt werden. Falls sich eine Probe dennoch nicht löst, so kann vor der eigentlichen Methylierung mehrmals vormethyliert werden.

Herstellen des Kaliummethylsulfinylcarbanions

Ca. 5g ölige Kaliumhydrid-Suspension (entsprechend etwa 1g Kaliumhydrid) wurden viermal mit je 20ml trockenem Hexan gewaschen und jedesmal abzentrifugiert (2min, 1000UpM, 20°C). Danach wurde das gereinigte Kaliumhydrid erneut in 20ml Hexan suspendiert. Nach Sedimentation des festen Kaliumhydrids wurde das Hexan mit Stickstoff abgeblasen und nach Eiskühlung des trockenen Kaliumhydrids unter Argonatmosphäre und ständigem Rühren langsam 13ml wasserfreies DMSO zugegeben (starke Wasserstoffbildung !!). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur gebracht. Nach Beendigung der Reaktion (ca. 30min) wurde die Lösung in eine Ampulle überführt, zugebördelt und zentrifugiert (3min, 1000UpM). Es entstand eine graugrüne Lösung, welche bei -20°C ca. 1Monat stabil blieb.

Methylierung von in DMSO unlöslichen Substanzen

Die in 200µl DMSO suspendierten, feingepulverten Substanzen wurden vor der eigentlichen Methylierung zweimal mit wenig Methyliodid vormethyliert: zu der Suspension wurden 20µl Kaliummethylsulfinylcarbanion zugegeben, gemischt und 5µl eiskaltes Methyliodid zugesetzt. Nach Durchmischen wurden erneut 60µl Kaliummethylsulfinylcarbanion hinzugefügt, gemischt, mit Eis gekühlt, 15µl eiskaltes Methyliodid zugesetzt

und gemischt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis die Probe vollständig gelöst war. Danach wurde wie im folgenden beschrieben methyliert.

Methylierung

Zu den gelösten Proben wurden 250µl Kaliummethylsulfanylcarbanion zugegeben und gemischt. Nach 10min wurde die Lösung im Eisbad abgekühlt und 200µl eiskaltes Methyljodid zugegeben. Während sich die Mischung auf Raumtemperatur erwärmte, wurde immer wieder gemischt. 10min nach Zusatz von Methyljodid wurden 3ml Chloroform:Methanol (2:1) sowie 2ml demineralisiertes Wasser zugegeben und kräftig geschüttelt. Um die Phasentrennung zu erleichtern, wurde zentrifugiert (200g, 3min). Die obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert, ohne dabei die Phasengrenze zu zerstören. Der Waschprozeß wurde in gleicher Weise durch erneute Wasserzugabe viermal wiederholt. Nach dem letzten Abpipettieren der Oberphase wurden zur Entfernung von noch vorhandenem Wasser 2ml 2,2-Dimethoxypropan und 20µl Eisessig zugegeben. Nach Zusatz von einigen Siedesteinchen wurde die Mischung im Wasserbad (90°C) bis auf 200µl eingeeengt. Die restliche Flüssigkeit wurde mit Stickstoff abgeblasen.

Hydrolyse

0,3ml 2M Trifluoressigsäure wurde zu den methylierten Proben gegeben und die Lösung in verbördelten Ampullen im Trockenschrank für 60min auf 121°C erhitzt. Nach Abkühlen wurden die Proben im Wasserbad (40°C) mit Inertgas zur Trockne abgeblasen.

Reduktion und Acetylierung

1ml frisch bereitete 0,5M Natriumborhydridlösung (bzw. Natriumbordeuterid-Isg.) in 2M Ammoniak wurde zum trockenen Hydrolysat gegeben und der Ansatz 60min bei 60°C im Wasserbad reduziert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 0,5ml Aceton zugegeben und danach die Lösung im Wasserbad (40°C) mit Stickstoff zur Trockne abgeblasen. Der Rückstand wurde in 0,2ml Eisessig aufgenommen und 1ml Ethylacetat sowie 3ml Acetanhydrid wurden zugegeben. Nach Durchmischen wurden 100µl 60% Perchlorsäure als Katalysator für die Acetylierung zupipettiert und erneut gemischt. Nach 5min wurde mit Eis gekühlt und 10ml demineralisiertes Wasser sowie 200µl 1-Methylimidazol zugegeben, gemischt und die Lösung für weitere 5min stehen gelassen. 1ml Dichlormethan, gegebenenfalls mit 1,0mg myo-Inositolhexaacetat als internen Standard (Synthese siehe 2.21), wurden zugesetzt und geschüttelt. Die untere Phase wurde für die GC/MS-Untersuchung (siehe 2.17) verwendet.

2.17. Gaschromatographische Trennung der Alditolacetate und massenspektrometrische Untersuchung der Fraktionen (GC-MS)

Gerät:	Gaschromatograph HP 5890 series II (Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn)
Detektor:	Massenspektrometer HP 5971 A MSD (Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn)
Trärgas:	Helium, 1ml/min
Einspritzmenge:	1µl
Säule:	Fused silica Kapillarsäule OPTIMA 1701 (Fa. Macherey-Nagel, Düren), 14% Cyanopropylphenyl- 86% Dimethylpolysiloxan, 25m x 0,25mm I.D., 0,25µm Filmdicke
Temperaturprogramm:	Injektortemperatur: 260°C Detektortemperatur: 210°C, 5min 5°C/min auf 235°C, 1°C/min auf 245°C, 10°C/min auf 260°C

Die Massenspektren wurden im EI-Modus aufgenommen.

Die Messungen konnten an den Geräten des Arbeitskreises von Prof. F. Bracher, Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung, LMU-München, durchgeführt werden.

2.18. Bestimmung des Acetylierungsgrades nach McCOMB [1957]

Reagenzien:	NaOH-Lösung: 9,4% (m/V) in demineralisiertem Wasser Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung: 3,75% (m/V) in demineralisiertem Wasser Saure Methanol-Lösung: 35,2ml 70% Perchlorsäure wurden in einem 500ml Meßkolben vorgelegt, eisgekühlt und mit kaltem Methanol auf 500ml aufgefüllt. FeClO ₄ -Lösung: 1,93g FeCl ₃ ·6H ₂ O wurden in 5ml konzentrierter HCl gelöst. Zu dieser Lösung wurden 5ml 70% Perchlorsäurelösung zugegeben und die Mischung fast zur Trockne einrotiert. Mit Wasser
-------------	---

wurde auf 100ml aufgefüllt (= Stammlösung). Zu 60ml der Stammlösung wurden 8,3ml 70% Perchlorsäure zugegeben, eisgekühlt und mit Methanol auf 500ml aufgefüllt.

Glucosepentaacetat-Standards:

108,9mg Glucosepentaacetat (Fa. Sigma) wurden in einem 100ml Meßkolben unter vorsichtigem Erwärmen in 5ml Ethanol gelöst. Anschließend wurde mit Wasser auf 100ml aufgefüllt. Aliquote Anteile (2, 4, 5, 7ml) dieser Lösung wurden mit Wasser zu je 50ml ergänzt. 500µl dieser Lösungen enthielten 120, 240, 300 und 420µg als Acetylgruppen.

Durchführung

200µl einer frisch zubereiteten Mischung aus gleichen Teilen der NaOH-Lösung und der Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung wurden in einem 2ml Meßkölbchen vorgelegt. Dazu wurden unter Schütteln 500µl der wässrigen Lösung eines acetylierten Polysaccharides (10mg/ml) zupipettiert. Nach 5min wurden 500µl der sauren Methanol-Lösung zugegeben und geschüttelt. Mit der FeClO_4 -Lösung wurde unter Schütteln in kleinen Anteilen auf 2,0ml aufgefüllt. Die Extinktion wurde bei 520nm gegen eine Nullkontrolle gemessen. Als Standard für die Eichgerade wurde Glucosepentaacetat verwendet.

2.19. Bestimmung von Uronsäureestern [SCHÖLLHORN, 1994]

Reagenzien:

Farbreagenzlösung:

40,7mg 4-Aminoantipyrin und 113mg Phenol ad 10ml destilliertes Wasser

Standardlösungen:

5,0mg Pektin, Methoxygehalt 9,5% nach USP XXI, (Fa. Sigma, Taufkirchen) ad 25ml destilliertes Wasser. Zur vollständigen Lösung des Pektins mußte der Meßkolben in ein kochendes Wasserbad gestellt werden. Zum Aufstellen einer Eichgerade wurden Aliquote von 850, 600, 400 und 200µl eingesetzt.

Polysaccharidlösungen:

5,0mg Polysaccharid ad 850µl destilliertes Wasser

Pektinesterase (EC 3.1.1.11, Fa. Sigma, Taufkirchen)-Lösung:

20U/ml in destilliertem Wasser

Alkoholoxidase (EC 1.1.3.13, Fa. Sigma, Taufkirchen)-Lösung:
10U/ml in 0,1M Kaliumphosphatpuffer pH=7,5

Peroxidase (EC 1.11.1.7, Fa. Sigma, Taufkirchen)-Lösung:
20U/ml in destilliertem Wasser

Durchführung

Die Polysaccharidlösungen, die mit destilliertem Wasser auf 850µl ergänzten Standardaliquote sowie ein Blindwert aus 850µl destilliertem Wasser, wurden mit je 150µl 4N NaOH versetzt und 45min bei 60°C in verschlossenen Gefäßen hydrolisiert. Nach Abkühlen wurde durch Zugabe von 100µl 4N HCl und 1ml 1M Kaliumphosphatpuffer pH=7,5 neutralisiert. 50µl Farbreagenzlösung, 50µl Pektinesterase-Lösung, 50µl Peroxidase-Lösung und 50µl Alkoholoxidase-Lösung wurden zugegeben.

2.20. Reduktion der Uronsäuren nach TAYLOR [1972]

Reagenzien: N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonat (Fa. Sigma, Taufkirchen)
2M Natriumborhydrid bzw. Natriumbordeuterid (Fa. Sigma, Taufkirchen) in destilliertem Wasser

Durchführung

Ca. 10mg Polysaccharid wurden in einem 50ml Rundkolben in 10ml destilliertem Wasser gelöst und etwa 100mg N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonat zugefügt. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wurde während einer Zeitspanne von 2h durch Titration mit 0,01M HCl unter ständigem Rühren konstant auf pH=4,75 gehalten. Nach der zweistündigen Umsetzungszeit wurde ein Tropfen n-Octanol zur Entschäumung zugegeben und langsam unter Rühren 10ml einer unmittelbar zuvor hergestellten 2M wässrigen NaBH₄-Lösung zuge tropft. Der pH-Wert der Lösung wurde während des Zutropfens mit einer 4N HCl auf 7,0 konstant gehalten. Nach vierstündigem Rühren bei pH= 7,0 wurde der Ansatz fünfmal mit je 5ml einer Mischung aus Essigsäure und Methanol (1:9, V/V) und anschließend viermal mit Methanolversetz und am Rotationsverdampfer einrotiert. Der erhaltene weiße Rückstand wurde in Wasser gelöst und dialysiert bzw. über eine Biogel P2-Säule entsalzt. Nach der Entsalzung wurde das reduzierte Polysaccharid gefriergetrocknet.

Bei Reduktionen, bei denen Deuterium eingebaut werden sollte, wurde das Polysaccharid in D₂O (Fa. Sigma, Taufkirchen) gelöst, als Reduktionsmittel NaBD₄ (Fa. Sigma, Taufkirchen) verwendet und der pH-Wert mit DCl (Fa. Sigma, Taufkirchen) eingestellt.

2.21. Synthese von Inosithexaacetat

5mg myo-Inosit wurden in 5ml 1-Methylimidazol (Fa. Sigma, Taufkirchen) suspendiert. 50ml Acetanhydrid wurden langsam unter Rühren zugegeben. Nach 15min wurden 200ml demineralisiertes Wasser zugesetzt, um überschüssiges Acetanhydrid zu zerstören. Das entstandene Inosithexaacetat wurde in Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Abrotieren des Dichlormethans wurde der Rückstand in wenig Aceton gelöst und das Inosithexaacetat durch Wasserzugabe ausgefällt. Die Reinheit des synthetisierten Produkts wurde gaschromatographisch bestätigt.

3. PHYTOCHEMISCHE ARBEITSMETHODEN

3.1. Gewinnung der Polysaccharidrohgemische aus dem Heißwasserextrakt

Gerät: Sepatech Varifuge 20RS und Varifuge 22S mit Festwinkelrotor HFA 12.500, Festwinkelrotor HFA 22.500 (Fa. Heraeus Christ, Osterode)
KPG-Rührer
Flügelrührer

Durchführung

Gepulverte, getrocknete Droge (*Phyllanthus amarus*, *Cissus quadrangularis* oder *Mucuna pruriens*) wurden im Verhältnis 1:10 mit demineralisiertem Wasser bei 90°C für 1h unter ständigem Rühren (KPG-Rührer mit Flügelrührer) extrahiert. Nach Abtrennen des Drogenrückstandes bzw. den unlöslichen Extraktanteilen durch Zentrifugieren (25min, 9000UpM, 20°C) erhielt man den Heißwasserextrakt und nach Abtrennung der niedermolekularen Moleküle mittels Dialyse und anschließender Lyophilisation die hochmolekularen Anteile.

Diese wurden im Verhältnis 1:10 in demineralisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde bei 4°C unter Rühren langsam das gleiche Volumen Ethanol zugetropft. Den erhaltenen Niederschlag ließ man über Nacht altern und zentrifugierte (25min, 9000UpM, 4°C) vom Überstand ab. Das Präzipitat stellte die 1+1-Polysaccharidroh-fällung dar. Den Überstand behandelte man analog mit 3 Volumina Ethanol und erhielt die 1+4-Polysaccharidroh-fällung.

3.2. TCA-Proteinfällung aus dem Polysaccharidrohgemisch

Reagenzien: Trichloressigsäure (Fa. Merck, Darmstadt) 15% (m/V) in demineralisiertem Wasser
Methanol, technisch

Durchführung

4g Rohpolysaccharid wurden in 150ml demineralisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurden im Eisbad langsam 150ml 15% Trichloressigsäure (TCA) hinzugetropft und 1h dort stehen gelassen. Nach dem Abzentrifugieren (15min, 9000UpM, 4°C) der ausgefallenen Proteine wurden die Polysaccharide im klaren Überstand mit der 4fachen Menge Methanol versetzt. Den ausgefallene Polysaccharidniederschlag ließ man über Nacht altern, bevor dieser abzentrifugiert (20min, 9000UpM, 4°C), in wenig demineralisiertem Wasser gelöst, dialysiert und lyophilisiert wurde.

3.3. Anionenaustauschchromatographie

Material: DEAE-Sepharose CL 6B (Fa. Pharmacia, Freiburg)
Säule: A= 5,3cm², l=30cm (Fa. Pharmacia, Freiburg)
Eluent: 20mM TRIS-Puffer pH=7,3
20mM TRIS-Puffer pH=7,3 mit 1M NaCl (Gradientenelution)
Durchfluß: 30ml/h
Fraktionen: 10ml (=20min)
Fraktionssammler: LKB 2111 Multirac (Fa. LKB, Bromma, Schweden) oder LKB 2070 Ultrorac II (Fa. LKB, Bromma, Schweden)
Pumpe: LKB 2132 Microperpex - peristaltic pump (Fa. LKB, Bromma, Schweden)

Durchführung

500mg Polysaccharidrohfraktion wurden in 15ml TRIS-Puffer gelöst und auf eine DEAE-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach Elution der neutralen Fraktion mit 150ml TRIS-Puffer wurden sukzessive die sauren Fraktionen mittels Gradientenelution (500ml TRIS-Puffer, NaCl-Gradient 0→1M) eluiert. Die Detektion der einzelnen Fraktionen erfolgte über Messung der optischen Drehung. Nach Dialyse gegen demineralisiertes Wasser und Lyophilisation erhielt man die Polysaccharidfraktionen.

3.4. Gelpermeationschromatographie

3.4.1. Weitere Aufreinigung

Material:	Fraktogel [®] TSK HW-65 (F) bzw 55 oder 50 (Fa. Merck, Darmstadt)
Säule:	A= 2,0cm ² , l=cm (Fa. Pharmacia, Freiburg)
Eluent:	0,05M Na-phosphatpuffer pH=7,2 mit 0,15M NaCl und 0,02% (m/V) NaN ₃
Durchfluß:	5ml/h
Auftragsmenge:	30-40mg
Fraktionierung:	10ml Fraktionen (=20min)
Fraktionssammler:	LKB 2111 Multirac (Fa. LKB, Bromma, Schweden) oder LKB 2070 Ultrorac II (Fa. LKB, Bromma, Schweden)
Pumpe:	LKB 2132 Microperpex - peristaltic pump (Fa. LKB, Bromma, Schweden)

Durchführung

30-40mg Polysaccharidrohfraktion wurden in 3ml Eluens gelöst und auf eine Fraktogel[®]-Säule aufgetragen. Die Detektion der einzelnen Fraktionen erfolgte über Messung der optischen Drehung. Nach Dialyse gegen demineralisiertes Wasser und Lyophilisation erhielt man die Polysaccharidfraktionen.

3.4.2. Entsalzung

Material:	Biogel P2 (Fa. Biorad, München)
Säule:	A= 2,0cm ² , l=40cm (Fa. Pharmacia, Freiburg)
Eluent:	demineralisiertes Wasser
Durchfluß:	5ml/h
Fraktionierung:	2,5ml Fraktionen (=30min)
Fraktionssammler:	LKB 2111 Multirac (Fa. LKB, Bromma, Schweden) oder LKB 2070 Ultrorac II (Fa. LKB, Bromma, Schweden)
Pumpe:	LKB 2132 Microperpex - peristaltic pump (Fa. LKB, Bromma, Schweden)

Durchführung

20-30mg Polysaccharidfraktion wurden in 3ml demineralisiertem Wasser gelöst und auf eine Biogel-P2-Säule aufgetragen. Die Detektion der einzelnen Fraktionen erfolgte über Messung der optischen Drehung. Die betreffenden Fraktionen wurden vereingt und lyophilisiert.

3.5. Hydrolysen

3.5.1. Totalhydrolyse

1-2mg Polysaccharid wurden in einer 25ml Glasampulle mit 2ml 2M Trifluoressigsäurelösung versetzt und die Ampulle zugebördelt. Daraufhin wurde die Lösung 90min bei 121°C im Trockenschrank erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Hydrolysat in einen 25ml Spitzkolben überführt, zur Trockne eingengt, zweimal in Wasser aufgenommen und erneut einrotiert.

3.5.2. Partialhydrolyse nach BUCHALA [1981]

10-30mg Polysaccharid wurden in einer 25ml Glasampulle mit 2,5ml 0,05M Trifluoressigsäure versetzt und 2h bei 100°C im Trockenschrank im verbördelten Gefäß erhitzt. Anschließend wurde die Lösung gegen demineralisiertes Wasser dialysiert oder mittels Biogel P2 entsalzt. Die hochmolekulare Fraktion wurde gefriergetrocknet und für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt.

3.5.3. Enzymatische Hydrolyse mit Pektinase

1mg Polysaccharid wurde in 200µl destilliertem Wasser gelöst, mit 5µl Pektinase (Fa. Sigma, Taufkirchen) 3h bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Die freigesetzte Uronsäure wurden dünnenschichtchromatographisch mit Referenzsubstanzen nachgewiesen.

3.6. Sulfatierung

Sulfatierung in DMF

100mg Polysaccharid B aus *P. amarus*, das 24h im Vakuum über P₂O₅ getrocknet wurde, wurden in 4ml DMF suspendiert und 1h im Ultraschallbad stehen gelassen. Unter Schutzgas (Argon) wurde über Nacht (17h) bei 80°C gerührt, 250µl Pyridin (äquimolare Menge zum Sulfatierungsreagenz) tropfenweise hinzugegeben und weitere 7h bei 80°C gerührt. Anschließend wurde über 2h tropfenweise 420mg SO₃*Pyridin (Fa. Sigma, Taufkirchen)-Lösung (in 4ml DMF) zugetropft und weitere 17h bei 80°C gerührt.

Sulfatierung in DMSO

Analog zur oben beschriebenen Methode mit 49mg Polysaccharid B, 3ml DMSO, 125µl Pyridin und 210mg SO₃*Pyridin (Fa. Sigma, Taufkirchen) in 2ml DMF.

Alle Arbeitsschritte wurden unter Argonatmosphäre und Rühren mit Magnetrührer durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel Pyridin, DMF und DMSO wurden zuvor über Molekularsieb getrocknet.

Aufarbeitung

Nach dem Abkühlen wurde der gesamte Reaktionsansatz in ein eisgekühltes Becherglas gegossen, evtl im Kolben verbliebenes Produkt wurde mit 4M NaOH gelöst und mit dem Reaktionsansatz vereinigt. Unter Kühlen wurde bis zur vollständigen Lösung des Produkts 4M NaOH zugegeben. Die Lösung wurde mit demineralisiertem Wasser auf ca. 200ml verdünnt, unter fließendem Wasser 5 Tage dialysiert und lyophilisiert

4. ISOLIERUNG DER GALLOTANNINE

125,1g getrocknete gepulverte Droge wurden unter Rühren 2h im Verhältnis 1:10 (m/V) mit Methanol rückflußgekocht. Nach Filtrieren wurde das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt und der Drogenrückstand noch zweimal extrahiert. Die Filtrate wurden vereinigt und bis zur Trockne eingeeengt. Die Ausbeute an Methanolextrakt betrug 24,5g (19,6%). Zur Anreicherung der Gallotannine wurde der Extrakt portionsweise in Wasser digeriert und die vereinigten wässrigen Phasen erschöpfend gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. Hierdurch wurden Chlorophyll und andere lipophile Verbindungen abgetrennt. Alle wässrigen Phasen wurden vereinigt und zur Abtrennung von organischem Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt. Nach Lyophilisation wurden 14,3g (11,4%) einer mit Gallotanninen angereicherten Extraktfraktion erhalten.

5. PHARMAKOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN

5.1. Zytotoxizität

Die *in vitro*-Toxizität wurde durch den WST-1 Assay (Fa. Boehringer Mannheim/Roche, Katalog-Nr. 1644807) ermittelt.

Zellkultur

HepG2 Zellen wuchsen in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (suppl. mit 10% FKS, Glutamin und Penicillin/Streptomycin) (Fa. Gibco BRL) in einer 5% CO₂-Atmosphäre bei 37°C.

WST-1 Test

HepG2 Zellen (10.000/well) wurden in Mikrotiterplatten (100µl Medium/well) ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gezogen. Die Zellen wurden mit den Testsubstanzen für 6h bzw. 12h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugegeben. Nach Zugabe von 10µl/well WST-1 Reagenz wurde erneut für 1h im Brutschrank inkubiert. Die Absorption wurde gegen den Blindwert der Kontrolle mittels Mikrotiterplattenreader bei einer Wellenlänge von 420nm gemessen.

Die Bestimmung wurde von dem Arbeitskreis von Dr. M. Ott, Medizinische Hochschule Hannover, durchgeführt.

5.2. Phagozytose- und „oxidative burst“-Aktivität

Methode

Phagozyten wurden mit Anti-CD13-RPE Antikörpern, *C. albicans* mit Calcein-AM und *S. aureus* mit BacLight markiert. Die „oxidative burst“-Aktivität wurde anhand der Oxidation von Dihydroethidium gemessen.

Material

CD13-RPE Antikörper (Fa. Coulter, Krefeld), Dihydroethidium (DHE), N-Ethyl-maleinacetamid (NEM), Tween-20, Triton X-100, Azure A, RPMI-1640 (Fa. Sigma, St. Louis, USA), Calcein-AM, BacLight-Bakterienvitalitätstest (Molecular Probes, Eugene, USA).

Zellmarkierung und Aktivierung

Zuerst wurde das Blut mit DHE (20µl PBS enthalten 0.5µg DHE pro 1ml Blut) 10min bei 37°C in einem Schüttler inkubiert, um den Farbstoff in die PMN diffundieren zu

lassen. Bei Anwesenheit von oxidativen Substanzen wird der Farbstoff oxidiert und die gebildete rote Fluoreszenz wird durchflußzytometrisch vermessen. Um ein optimales Verhältnis von 1:1 zwischen den PMN und *C. albicans* (bzw. 1:50 (zw. PMN und *S. aureus*)) zu erhalten, wurde die Mikroorganismen enthaltende RPMI Lösung vorsichtig mit PBS verdünnt und gemischt. Entsprechend der eingesetzten Inkubationskonzentration (0,2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 und 25 min für die Phagozytose und 0, 5, 10, 15, 20, 30 and 40 min für die „oxidative burst“-Aktivität) wurden PP-Röhrchen mit 50µl RPMI Lösung, die 0.5% Glucose enthält, vorbereitet und mit Eis gekühlt. Mikroorganismen und Blut wurden gemischt, 100µl Aliquots in die Röhrchen gegeben und die Inkubation bei 37°C begonnen.

Bestimmung der Phagozytose- und der „oxidative burst“-Aktivität

Zu bestimmten Zeiten wurde die Reaktion durch Zugabe von 200µl eiskaltem NEM gestopt. Nach Zentrifugation (4°C, 250g, 5min) wurden die Pellets zur Orangeanfärbung der PMN mit 100µl PBS mit 0,8µl CD13-RPE-Antikörper versetzt und bei Raumtemperatur 20min inkubiert. Nach Zugabe von 1ml des Lysepuffers für Erythrozyten (enthält 8,27mg Ammoniumchlorid, 1mg Kaliumhydrogencarbonat und 0,04mg Natrium-EDTA) pro Röhrchen wurde für weitere 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die eisgekühlten Zellproben mittels Durchflußzytometrie vermessen.

Die Tests wurden von Herrn Basiry aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Adam, Dr. von Haunersches Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt.

5.3. Antivirale Aktivität

HEPATITIS B

Zellkultur

HepG2 Zellen wuchsen in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (suppl. mit 10% FKS, Glutamin und Penicillin/Streptomycin) (Fa.Gibco BRL) in einer 5% CO₂-Atmosphäre bei 37°C.

Semiquantitative Bewertung der Hepatitis B Virus-DNA in HepG2.2.15 Zellen:

HepG2.2.15 Zellen wurden mit Medium, das das Phyllanthus Hauptpolysaccharid in Konzentrationen von 1, 10, 25 oder 50µl/ml enthielt (Stammlösung: 2mg/ml), für 7 Tage inkubiert. Nach Waschen mit PBS-Pufferlösung wurden die Zellen geerntet und homogenisiert. Die homogenisierten Zellsuspension wurde im einer Mikrofuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert und

Protein A Agarose Kügelchen („beads“), die mit Anti-HBc Antikörpern gefüllt waren, hinzugefügt. Die Kügelchen wurden dreimal mit TNE-Pufferlösung gewaschen und für 12h bei 4°C inkubiert. Nach dem letzten Waschen wurde das Pellet mit DNAse (1U/µl) und RNAse (1U/µl) in TNE-Pufferlösung unter Anwesenheit von MgCl₂ für 30min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TNE-Pufferlösung wurde das Pellet mit Proteinase K (0,5mg/ml) in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (1%) und Sarcosyl bei 37°C für 12h behandelt, um die virale DNA freizusetzen. Die DNA wurde durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion gereinigt und in Anwesenheit von 10µg tRNA gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 20µl TNE-Puffer resuspendiert und unter denaturierenden Bedingungen in einem 1%igen basischen Agarosegel getrennt. Die „southern blot“-Analyse wurde auf einer Nylonmembran (Biodyne B, Fa. Pall Corporation, USA) durchgeführt. Zur Detektion der viralen DNA wurde die monomere DNA aus pHBV1.5 herausgeschnitten, die mit ³²P durch eine „random priming“-Prozedur markiert worden war. 106 cpm/ml wurden zur Hybridisation eingesetzt.

Die Bestimmungen wurden von dem Arbeitskreis von Dr. M. Ott, Medizinische Hochschule Hannover, durchgeführt.

HIV-1

Zytotoxizitätsassay

Die Zytotoxizität wurde durch den XTT-Test oder durch Trypanblaufärbung der vitalen Zellen ermittelt. MT4 Zellen wurden über 7 Tage mit und ohne Behandlung gezogen. Die Toxizität wurde als prozentuale Lebensfähigkeit im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt.

MAGI-Assay (multinukleare Aktivierung der Galaktosidase Induktion – Assay)

Infektion der MAGI Reporterzelllinie: Virus und Testsubstanz wurden bei 37°C 30min in 100µl vorinkubiert und dann zu den in 200µl vorgelegten MAGI-Zellen gegeben und für 2 Tage bei 37°C inkubiert.

Virus/Hemmstoff Interaktionstest

- Inkubation des Virus mit dem Hemmstoff:
Virus und Probe wurden bei 37°C in 1ml 60min vorinkubiert.
- Entfernung des ungebundenen Hemmstoffs:
Der Virus-Proben-Mix wurde in einem Konzentrator (MACROSEP, Pall Filtron, 300kD Ausschlußgröße) zentrifugiert, zweimal mit 10ml PBS gewaschen, erneut aufkonzentriert und auf 1ml eingestellt. PBS diente als Negativkontrolle.

- Infizierung:
MAGI Zellen wurden mit 100µl des vorbehandelten Virus infiziert, für zwei Tage inkubiert und die Reduktion der Infektion im Vergleich zu mit PBS behandelten Zellen mittels Zytotoxizitätsassay ermittelt.

Virus Internalisationstest

Der Viruseintrag wurde durch den von SAPHIRE [1999] beschriebenen Assay mit geringen Veränderungen kontrolliert:

MAGI Zellen (in 100ml) wurden bei 4°C für 60min vorinkubiert, Virus und Testsubstanz wurden hinzugegeben und die Zellen für 30min bei 4°C und 2h bei 37°C inkubiert. Nach dem fünfmaligen Waschen der Zellen mit 500ml PBS zur Entfernung ungebundener Viren wurden die Zellen 5min trypsiniert, um alle anheftenden, aber nicht aufgenommenen Viren zu beseitigen. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen durch 100ml PBS mit 0,5% NP-40 lysiert. Der Gehalt an HIV-1 p24 der Zelllysate wurde mittels p24-sandwich ELISA bestimmt.

Die Bestimmungen wurden von Herrn Dr. F. Notka aus dem Arbeitskreis von Prof. R. Wagner, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (RIMMH) - Universität Regensburg, durchgeführt.

5.4. Antiphlogistische Aktivität

Hemmung des Rattenpfotenödemtests nach WINTER [1965]

Versuchstiere:	20 männliche Wistar-Ratten, 170-200g, (Charles River, Kisslegg), eingeteilt in Gruppen à 4 bzw. 3 Tiere
Gerät:	Plethysmometer Typ 7140, (Fa. U.Basile, Comerio, Italien)
Reagenzien:	λ-Carrageenan (Fa. Sigma, Taufkirchen), 0,5% Lösung in 0,9% NaCl-Lösung 0,9% NaCl-Lösung (Negativkontrolle) Indometacin (Fa. Sigma, Taufkirchen): 10mg/ml in 0,9% NaCl-Lösung (Positivkontrolle) Testsubstanzen: 10mg/ml und 20mg/ml in 0,9% NaCl-Lösung

Durchführung

Den nüchternen Ratten (10h ohne feste Nahrung) wurde 1h nach Gabe der Kontroll- bzw. Testsubstanzen (10mg/kg intraperitoneal) 0,1ml einer 0,5% Carrageenanlösung in die Plantaregion der rechten Hinterpfote injiziert. Das Ödemvolumen wurde 2, 4, 6 und 24h nach der Carrageenanprovokation mittels Plethysmometer gemessen. Die

prozentuale Reduktion des Ödemvolumens wurde auf die Negativkontrolle (0,9% NaCl-Lösung) bezogen. Als Referenzsubstanz diente Indometacin (10mg/kg in 0,9% NaCl-Lösung).

Der Test wurde von Dr. A. Subarnas, Department of Pharmacy in Sumedang, Indonesien, durchgeführt.

I LITERATURVERZEICHNIS

- ADESANYA, S., NIA, R., MARTIN, M.-T., BOUKAMCHA, N., MONTAGNAC, A., PAIS, M. **1999**, Stilbene derivatives from *Cissus quadrangularis*, *J. Nat. Prod.*, 62, 1694-1695.
- AKHTAR, M. S., QUERESHI, A. Q., IQBAL, J. **1990**, Antidiabetic evaluation of *Mucuna pruriens*, Linn seeds, *J. Pak. Med. Assoc.*, 40 (7), 147-150.
- ALBAN, S. **1993**, Synthese und physiologische Testung neuartiger Heparinoide, Dissertation, Universität Regensburg.
- ARUNA, V., NAIDU, K., SATYANARAYANA, T., GANAPATY, S. **1998**, Phytochemical studies on the roots of *Mucuna pruriens* Baker, *Indian Drugs*, 35 (6), 356-358.
- ASPINALL, G., BEGBIE, R., HAMILTON, A., WHYTE, J. N. C. **1967**, Polysaccharides of soy-beans. 3. Extraction and fractionation of polysaccharides from cotyledon meal, *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1*, 11, 1065-1070.
- ASPINALL, G. **1982**, The Polysaccharides, Vol. 1, Molecular Biology, Pergamon Press limited, New York.
- ASPINALL, G. **1983**, The Polysaccharides, Vol. 2, Molecular Biology, Pergamon Press limited, New York.
- BAL, S. N. **1984**, Botanical survey of India - Catalogue of medicinal plant exhibits, Bishen Singh Mahendra Pal Singh, India.
- BHADDBHADE, M., RAO, G., VEKATESAN, K. **1980**, Concerning hypophyllanthin, *Tetrahedron Letters*, 2 (31), 3097-3098.
- BHATTACHARYA, S., DAS, N., RAO, P. J. **1987**, Effect of pre-existing inflammation on carrageenan-induced paw oedema in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, 39 (10), 854-856.
- BIERMANN, C. J., MCGINNIS, G. D. **1989**, Analysis of carbohydrates by GLC and MS, CRC Press, Boca Raton.
- BITTER, T., MUIR, H. M. **1962**, A modified uronic acid carbazole reaction, *Anal. Biochem.*, 4, 330-334.

- BJÖRNDAL, H., HELLERQVIST, C., LINDBERG, B., SVENSSON, S. **1970**, Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie bei der Methylierungsanalyse von Polysacchariden, *Angew. Chem.*, 16, 643-674.
- BLAKENEY, A., HARRIS, P. H. R., STONE, B. **1983**, A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis, *Carbohydr. Res.*, 113, 291-299.
- BLUMBERG, B. S., MILLMAN, I., VENKATESWARAN, P., THYAGARAJAN, S. P. **1990**, Hepatitis B virus and primary hepatocellular carcinoma: treatment of HBV carriers with *Phyllanthus amarus*, *Vaccine*, 8 (Suppl.), S86-S92.
- BLUMENKRANTZ, N., ASBOE-HANSEN, G. **1973**, New method for quantitative determination of uronic acids, *Anal. Biochem.*, 54, 484-489.
- BRILLOUET, J.-M., WILIAMS, P., WILL, F., MUELLER, G., PELLERIN, P. **1996**, Structural characterization of an apple juice arabinogalactan-protein wick aggregates following enzymic dearabinosylation, *Carbohydr. Polym.*, 29 (3), 271-275.
- BUCHALA, A. J., MEIER, H. **1981**, An arabinogalactan from the fibres of cotton, *Carbohydr. Res.*, 89, 137-143.
- BUCKERIDGE, M. S., PANEGASSI, V. R., ROCHA, D. C., DIETRICH, S. M. C. **1995**, Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae, *Phytochemistry*, 38 (4), 871-875.
- BÜECHI, S. **1998**, Antivirale Gerbstoffe – Pharmakologische und klinische Untersuchungen, *DAZ*, 14, 67-78
- BUTHANI, K. K., KAPOOR, R., ATAL, C. K. **1984**, Investigations of medicinal plants. Part II. Two unsymmetric tetracyclic triterpenoids from *Cissus quadrangularis*, *Phytochemistry*, 23 (2), 407-410.
- CALIXTO, J., SANTOS, A., PAULINO, N., FILHO, V., YUNES, R. **1997**, The plants of the genus *Phyllanthus* as a potential source of new drugs, *Nat. Prod. Res. Brazil*, 49 (5/6), 422-432.
- CALIXTO, J., SANTOS, A., FILHO, V., YUNES, R. **1998**, A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential, *Med. Res. Rev.*, 18 (4), 225-258.

- CAPEK, P., KUBACKOVA, M., ALFÖLDI, J., BILISICS, L., LISKOVA, D., KAKONIOVA, D. **2000**, Galactoglucomannan from the secondary cell wall of *Picea abies* L. Karst, *Carbohydr. Res.*, 329, 635-645.
- CAPEK, P., TOMAN, R., KARDOSOVA, A., ROSIK, J. **1983**, Polysaccharides from the roots of the marsh mallow (*Althaea officinalis* L.): structure of an arabinan, *Carbohydr. Res.*, 117, 133-140.
- CHATEAU, M.-T., CARAVANO, R. **1997**, The oxidative burst triggered by *Salmonella typhimurium* in differentiated U937 cells requires complement and a complete bacterial lipopolysaccharide, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 17 (1), 57-66.
- CHATTOPADHYAY, S., SHARMILA, D., MAHATO, S. **1994**, Production of L-DOPA from cell suspension culture of *Mucuna pruriens f. pruriens*, *Plant Cell Rep.*, 13 (9), 519-522.
- CHEN LIU, K. C. S., Lin, M.-T., LEE, S.-S., CHIOU, J.-F., REN, S., LIEN, E. J. **1999**, Antiviral tannins from two *Phyllanthus* species, *Planta Med.*, 65, 43-46.
- CHOPRA, R., NAYAR, S., CHOPRA, I. **1956**, Glossary of Indian Medicinal Plants, New Delhi.
- COLLINS, J., BRADBURY, J. **1981**, Structures of four new oligosaccharides from marsupial milk, determined mainly by ¹³C-NMR spectroscopy, *Carbohydr. Res.*, 92, 136-140.
- CRC PRESS **2000**, Dictionary of Natural Products (CD-ROM), Version 8/2000, Andover, England.
- DEUTSCHES ARZNEIBUCH – 10. AUFLAGE, **1990**, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.
- DAMAS, J., REMACLE-VOLON, G., DEFLANDRE, E. **1986**, Further studies of the mechanism of counter irritation by turpine, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 332 (2), 196-200.
- DAVIS, E., DERQUET, C., PENHOAT, C. **1990**, Isolation and NMR study of pectins from Flax (*Linum usitatissimum* L.), *Carbohydr. Res.*, 197, 205-215.
- DE CLERCQ, E. **1993**, Anti-HIV activity of sulfated polysaccharides, *Front. Biomed. Biotechnol.*, 1, 87-100.

- DE CLERCQ, E. **1995**, Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections, *Clin. Microbiol. Rev.*, 8, 200-239.
- DEY, A. C. **1980**, Indian medicinal plants used in ayurvedic preparations, Bishen Singh Mahendra Pal Singh, India.
- DINAND, E., VIGNON, M. R. **2001**, Isolation and NMR characterization of a (4-O-methyl-D-glucurono)-D-xylan from sugar beet pulp, *Carbohydr. Res.*, 330, 285-288.
- DOSHI, J., VAIDYA, R. A., ANTARKAR, D., DEOLALIKAR, R., ANTANI, D. **1994**, A two-stage clinical trial of *Phyllanthus amarus* in hepatitis B carriers: failure to eradicate the surface antigen, *Ind. J. Gastroenterol.*, 13, 7-8.
- EDWARDS, S. **1996**, The O₂⁻ generating NADPH oxidase of phagocytes: structure and methods of detection, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 9, Academic Press. Inc., 563-577.
- ERMEL, F., FOLLET-GUEYE, M., CIBERT, C., VIAN, B., MORVAN, C., CATESSON, A.-M., GOLDBERG, R. **2000**, Differential localization of arabinan and galactan side chains of rhamnogalacturonan 1 in cambial derivatives, *Planta*, 210, 732-740.
- FISCHER, B. **1992**, Chemische und immunologische Untersuchungen von Polysacchariden aus *Thuja occidentalis* L. und *Sabal serrulata*, ROEM. et SCHULT., Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- FOO, L., WONG, H. **1992**, Phyllanthusiin D, an unusual hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*, *Phytochemistry*, 31 (2), 711-713.
- FOO, L. **1993**, Amariin, a di-dehydrohexahydroxydiphenoyl hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*, *Phytochemistry*, 33 (2), 487-491.
- FOO, L. **1995**, Amariinic acid and related ellagitannins from *Phyllanthus amarus*, *Phytochemistry*, 39 (1), 217-224.
- FROHNE, D., JENSEN, U. **1996**, Systematik des Pflanzenreiches, Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.

- FUJII, Y. **1999**, Allelopathy of velvetbean: determination and identification of L-DOPA as a candidate of allelopathic substances, *Symp. 214th Am. Chem. Soc. Nat. 1. Meet.*, Biol. Act. Nat. Prod., CRC-Press, Boca Raton, 33-47.
- FUJIWARA, T., TAKEDA, T., OGIHARA, Y., SHIMIZU, M., NOMURA, T., TOMITA, Y. **1984**, Further studies on the structure of polysaccharides from the bark of *Melia azadirachta*, *Chem. Pharm. Bull.*, 32 (4), 1385-1391.
- FÜLLER, E., SOSA, S., TUBARO, A., ALBAN, S., FRANZ, G., DELLA LOGGIA, R. **2000**, Antiinflammatory activity of Chamomile polysaccharides, *Pharm. Pharmacol. Lett.*, 2, 86-87.
- GANTER, J., HEYRAUD, A., PETKOWICZ, C., RINAUDO, M., REICHER, F. **1995**, Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis, *Int. J. Biol. Macromol.*, 17 (1), 13-19.
- GAO, Q., KIYOHARA, H., CYONG, J., YAMADA, H. **1988**, Characterization of anti-complementary acidic heteroglycans from the leaves of *Panax ginseng* C:A. Meyer, *Carbohydr. Res.*, 181, 175-187.
- GARBACKI, N., GLOAGUEN, V., DAMAS, J., HOFFMANN, L., TITS, M., ANGENOT, L. **2000**, Inhibition of croton oil-induced edema in mice ear skin by capsular polysaccharides from Cyanobacteria, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 361 (4), 460-464.
- GHOSAL, S., SINGH, S., BHATTACHARYA, S. K. **1971**, Alkaloids of *Mucuna pruriens*: chemistry and pharmacology, *Planta Med.*, 19 (3), 279-284.
- GONDA, R., TOMODA, M., SHIMIZU, N., KANARI, M. **1990**, Characterization of polysaccharides having activity on the reticuloendothelial system from the rhizome of *Curcuma longa*, *Chemotaxon. Legum.*, 38 (2), 482-486.
- GOPAL, G. V. **1991**, "Kauncha beej" an ingredient of "Vita-ex" - its botany, chemistry and folklore uses in orissa, *J. Econ. Taxon. Bot.*, 15 (3), 677-682.
- GRASDALEN, H., PAINTER, T. **1980**, NMR studies of composition and sequence in legume-seed galactomannans, *Carbohydr. Res.*, 81, 59-66.
- GUISELEY, K. B. **1978**, Some novel methods and results in the sulfation of polysaccharides, *Carbohydrate Sulfates*, American Chemical Society, Washington D.C., 148-162.

- GUPTA, M., VERMA, R. **1990**, Unsymmetric tetracyclic triterpenoid from *Cissus quadrangularis*, *Phytochemistry*, 29 (1), 336-337.
- GUPTA, M., VERMA, R. **1991**, Lipid constituents of *Cissus quadrangularis*, *Phytochemistry*, 30 (3), 875-878.
- HAGER **1998**, Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Springer Verlag, Berlin.
- HAKOMORI, S. **1964**, A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in DMSO, *J. Biochem.*, 55, 205-208.
- HARA, C., KIHU, T., TANAKA, Y., UKAI, S. **1982**, Anti-inflammatory activity and conformational behavior of a branched (1→3)-β-glucan from an alkaline extract of *Dictyophora indusiata* FISCH., *Carbohydr. Res.*, 110, 77-87.
- HARRIS, P., HENRY, R., BLAKENEY, A., STONE, B. **1984**, An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, 127, 59-73.
- HARVEY, D. **1996**, Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of oligosaccharides and glycoconjugates, *J. Chromatogr. A*, 720, 429-446.
- HEGENDORF, S., PANNE, U., NIESSNER, R. **2001**, Die Asymmetrische Fluß-Feldflußfraktionierung - eine Methode zur Bestimmung der Molmasse von Polysacchariden (Poster), *Anakon - GDCh-Symposium*, Konstanz.
- HEGNAUER, R. **1973**, Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. 6, Birkhäuser Verlag, Basel, 694-697.
- HESSE, M., MEIER, H., ZEEH, B. **1991**, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Thieme Verlag, Stuttgart.
- HEUBL, G. **2000**, CMI-Symposium über *Phyllanthus amarus*, *3rd International congress on phytomedicine*, München.
- HOPPE, S. **1987**, Drogenkunde, de Gruyter, Berlin.
- HOUGHTON, P., WOLDEMARIAM, T., O'SHEA, S., THYAGARAJAN, S. **1996**, Two securinega-type alkaloids from *Phyllanthus amarus*, *Phytochemistry*, 43 (3), 715-717.

- HUSSAIN, G., MANYAM, B. **1997**, *Mucuna pruriens* proves more effective than L-DOPA in Parkinson's disease animal model, *Phytother. Res.*, 11 (6), 419-423.
- IKUTA, K., SHIBATA, N., BLAKE, J., DAHL, M., NELSON, R., HISAMICHI, K., KOBAYASHI, H., SUZUKI, S., OKAWA, Y. **1997**, NMR study of the galactomannans of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*, *Biochem. J.*, 323, 297-305.
- INGOLFSDOTTIR, K. **2000**, Bioactive compounds from Iceland moss, *Bioactive carbohydrate polymers*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Niederlande, 25-36.
- JANSSON, P.-E., KENNE, L., LIEDGREN, H., LINDBERG, B., LÖNNGREN, J. **1976**, A practical guide to the methylation of carbohydrates, *chem. comm / Univ. Stockholm*, 8 (15), 1-75.
- JOY, K. L., KUTTAN, R. **1998**, Inhibition by *Phyllanthus amarus* of hepatocarcinogenesis induced by N-Nitrosodiethylamin, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 24, 133-139.
- KANARI, M., TOMODA, M., GONDA, R., SHIMIZU, N., KIMURA, M., KAWAGUCHI, M., KAWABE, C. **1989**, A reticuloendothelial system-activating arabinoxylan from the bark of *Cinnamomum cassia*, *Chem. Pharm. Bull.*, 37 (12), 3191-3194.
- KEENAN, M., BELTON, P., MATTHEW, J., HOWSON, S. **1985**, A ¹³C-NMR study of sugar-beet pectin, *Carbohydr. Res.*, 138, 168-170.
- KHOTIMCHENKO, Y. S., KHASINA, E. I., KOVALEV, V. V., SHEVTSOVA, O. I., SHESTAKOVA, S. V. **2000**, The efficiency of dietary non-starch polysaccharides in experimental toxic hepatitis, *Vopr. Pitan*, 69 (1/2), 22-26.
- KIYOHARA, H., CYONG, J., YAMADA, H. **1988**, Structure and anti-compemetary activity of pectic polysaccharides isolated from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa, *Carbohydr. Res.*, 182, 259-275.

- KIYOHARA, H., CYONG, J., YAMADA, H. **1989**, Relationship between structure and activity of the "ramified" region in anti-complementary pectic polysaccharides from *Angelica acutiloba* Kitagawa, *Carbohydr. Res.*, 193, 201-214.
- KRAUS, S. **1998**, Zum Wirkungsmechanismus antiinflammatorischer Polysaccharide aus *Urtica dioica* L. und Untersuchungen zur Fluoreszenz-, Radioaktiv- und Goldmarkierung von Polysacchariden, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- KULICKE, W. M., LANGE, S., HEINS, D. **1999**, Advantages of determining the molar mass distributions of water-soluble polymers and polyelectrolytes with FFFF-MALLS and SEC-MALLS, *Chromatography of polymers: hyphenated and multidimensional techniques*, American Chemical Society, 114-140.
- KUROKAWA, Y., TAKEDA, T., OGIHARA, Y., SHIMIZU, M., TAKAI, M. **1988**, Studies on the structure of a minor polysaccharide from the bark of *Meli azadirachta*, *Chem. Pharm. Bull.*, 36 (7), 2654-2660.
- LEE, C., OTT, M., THYAGARAJAN, S. P., SHAFRITZ, D., BURK, R., GUPTA, S. **1996**, *Phyllanthus amarus* down-regulates hepatitis B virus mRNA transcription and replication, *Eur. J. Clin. Invest.*, 26, 1069-1076.
- LINDBERG, B. **1972**, Methylation analysis of polysaccharides, *Meth. Enzym.*, 28, 178-195.
- LINDBERG, B. **1981**, Haworth memorial lecture: structural studies of polysaccharides, *Chem. Soc. Rev.*, 10, 409-434.
- LIU, M. K., GIDDINGS, J. C. **1993**, Separation and measurement of diffusion coefficients of linear and circular DNAs by flow field-flow fractionation, *Macromolecules*, 26, 3576-3588.
- LOHMANN-MATTHES, M. L., WAGNER, H. **1989**, Aktivierung von Makrophagen durch Polysaccharide aus Gewebekulturen von *Echinacea purpurea*, *Z. Phytother.*, 10, 52-59.
- LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A., RANDALL, R. **1951**, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LÜSCHER-MATTLI, M. **2000**, Polyanions - a lost chance in the fight against HIV and other virus diseases?, *Antiviral Chem. Chemother.*, 11, 249-259.

- LUND, K., RIMPLER, H. **1985**, Tormentilla root. Isolation of an ellagitannin and pharmacological screening, *DAZ*, 3, 105-108
- MACHUKA, J. **2000**, Characterization of seed proteins of velvet bean (*Mucuna pruriens*) from Nigeria, *Food Chem.*, 68 (4), 421-427.
- MAHAJANI, S., DOSHI, V., PARIKH, K., MANYAM, B. **1996**, Bioavailability of L-DOPA from HP-200 formulation of seed powder of *Mucuna pruriens* (Bak): a pharmacokinetic and pharmacodynamic study, *Phytother. Res.*, 10 (3), 254-256.
- MANYAM, B. **1995**, An alternative medicine treatment for Parkinson's disease: results of a multicenter clinical trial. HP-200 in Parkinson's Disease Study Group, *J. Altern. Complement. Med. Fall.*, 1 (3), 249-255.
- MATTHEE, G., WRIGHT, A. D., KÖNIG, G. M. **1999**, HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin, *Planta Med.*, 65, 493-506.
- McCOMB, E., McCREADY, R. **1957**, Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers, *Anal. Chem.*, 29 (5), 819-821.
- McEWAN, T., McINNIS, A., SMITH, D. **1982**, ¹H- and ¹³C-NMR spectra of the methyl mono-, di, and tri-O-acetyl- α - and - β -D-xylopyranosides, *Carbohydr. Res.*, 104, 161-168.
- MEHROTRA, R., RAWAT, S., KULSHRESHTHA, D. K., GOYAL, P., PATNAIK, G. K., DHAWAN, B. N. **1988**, In vitro effect of *Phyllanthus amarus* on hepatitis B virus, *Ind. J. Med. Res.*, 93, 71-73.
- MEHTA, M., KAUR, N., BHUTANI, K. **2001**, Determination of marker constituents from *Cissus quadrangularis* Linn. and their quantitation by HPTLC and HPLC, *Phytochem. Anal.*, 12 (2), 91-95.
- MESTECKINA, N. M., ANULOV, O. V., SHCHERBUKHIN, V. D. **1998**, Study of galactomannan from *Amorpha fruticosa* L. seeds, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 34 (5), 549-552.
- MORI, M., KHOO, K. **1981**, An arabinoglucuronomannan from suspension-cultured cells of *Nicotiana tabacum*, *Carbohydr. Res.*, 91, 49-58.
- MORTON, J. **1985**, Atlas of medicinal plants of middle America, Bahamas to Yucatan, Charles C. Thomas Publ., Springfield, Illinois, 457-463.

- MUTSCHLER, E. **1996**, Arzneimittelwirkungen, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart.
- NAKANO, M., ITOH, Y., MIZUNO, T., NAKASHIMA, H. **1997**, Polysaccharide from *Aspalathus linearis* with strong anti-HIV activity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61 (2), 267-271.
- NAKASHIMA, H., MURAKAMI, T., YAMAMOTO, N., SAKAGAMI, H., TANUMA, S., HATANO, T., YOSHIDA, T., OKUDA, T. **1992**, Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds, *Antiviral Res.*, 18 (1), 91-103.
- NAWWAR, M., HUSSEIN, S., MERFORT, I. **1994**, NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*, *Phytochemistry*, 36 (3), 793-798.
- NEUWINGER, H. D. **1998**, Afrikanische Arzneipflanzen und Jagdgifte, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 29-33.
- NIU, J., WANG, Y., QIAO, M., GOWANS, E., EDWARDS, P., THYAGARAJAN, S. P., GUST, I., LOCARNINI, S. **1990**, Effect of *Phyllanthus amarus* on duck hepatitis B virus, *J. Med. Virol.*, 32, 212-218.
- NONAKA, G. I., NISHIOKA, I., NISHIZAWA, M., YAMAGASHI, T., KASHIWADA, Y., DUTSCHMANN, G. E., BODNER, A. J., KILKUSKIE, R. E., CHENG, Y. C., LEE, K. H. **1990**, Anti-AIDS agents, 2: Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells, *J. Nat. Prod.*, 53, 587-595.
- OGATA, T., HIGUCHI, H., MOCHIDA, S., MATSUMOTO, H., KATO, M., ENDO, T., KAJI, A., KAJI, H. **1992**, HIV-1 reverse transcriptase inhibitor from *Phyllanthus niruri*, *AIDS Res. Hum. Retrovir.*, 8, 1937-1944.
- OKUDA, T., YOSHIDA, T., HATANO, T. **1995**, Hydrolyzable tannins and related polyphenols, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, 66, 1-117.
- OTTERNESS, I. G., MOORE, P. F. **1988**, Carrageenan foot edema test, *Meth. Enzymol.*, 162, 320-327.

- PANIKKAR, K., MAJELLA, V., PILLAI, P. **1987**, Lecithin from *Mucuna pruriens*, *Planta Med.*, 53 (5), 503.
- PASQUIER, C., MARTY, N., DOURNES, J.-L., CHABANON, G., PIPY, B. **1997**, Implication of neutral polysaccharides associated to alginate in inhibition of murine macrophage response to *Pseudomonas aeruginosa*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 147 (2), 195-202.
- PAULSEN, B. **2000**, Bioactive carbohydrate polymers, *Proc. Phytochem. Soc. Eur.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- PEREIRA, B., SILVA, B., PEREIRA, N., PARENTE, J. **2000**, Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Periandra mediterranea*, *Phytochemistry*, 54, 409-413.
- PICTON, L., BATAILLE, I., MULLER, G. **2000**, Analysis of a complex polysaccharide (gum arabic) by multi-angle laser light scattering coupled on-line to size exclusion chromatography and flow field flow fractionation, *Carbohydr. Polym.*, 42, 23-31.
- PONDER, G., RICHARDS, G. **1998**, Arabinogalactan from western larch, Part III: alkaline degradation revisited, with novel conclusions on molecular structure, *Carbohydr. Polym.*, 34, 251-261.
- PRAS, N., BATTERMAN, S., DIJKSTRA, D., HORN, A. S., MALINGRE, T. M. **1990**, Continuous production of the pharmaceutical 7,8-dihydroxy N-di-n-propyl 2-aminotetralin using a phenol oxidase from cell cultures of *Mucuna pruriens*, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 23 (3), 209-215.
- PRAS, N., WOERDENBAG, H., BATTERMAN, S., VISSER, J., VAN UDEN, W. **1993**, *Mucuna pruriens*: improvement of the biotechnological production of the anti-Parkinson drug L-DOPA by plant cell selection., *Pharm. World Sci.*, 15 (6), 263-268.
- PRASAD, G., UDUPA, K. **1963**, Effect of *Cissus quadrangularis* on the healing of cortisone treated fractures, *Ind. J. Med. Res.*, 51 (4), 667-676.
- PRASAD, G., CHATTERJEE, S., UDUPA, K. **1970**, The effect of phytogetic steroid of *Cissus quadrangularis* (hadjora) on endocrine glands after fracture, *Ind. J. Med. Res.*, 4 (2), 132-141.

- PRESCOTT, J., ENRIQUEZ, P., JUNG, C., MENZ, E., GROMAN, E. **1995**, Larch arabinogalactan for hepatic drug delivery: isolation and characterization of a 9kD arabinogalactan fragment, *Carbohydr. Res.*, 278, 113-128.
- PROKSCH, A. **1982**, Über ein immunstimulierendes Wirkprinzip aus *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- PRUTHI, S. C. **2000**, Ayurvedic composition for the treatment of disorders of the nervous system including parkinson's disease, US, US 99-321917 19990529 (US 6106839 A 20000822), 1-3.
- PUHLMANN, J. **1989**, Immunologisch aktive Polysaccharide aus den Herbadrogen von *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. und *Arnica montana* L. sowie aus *Arnica montana* L. Zellkulturen, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- PUHLMANN, J., ZENK, M., WAGNER, H. **1991**, Immunologic active polysaccharides. Part 8. Immunologically active polysaccharides of *Achyrocline satureioides*, *Phytochemistry*, 31 (8), 2617-2621.
- PUHLMANN, J., KNAUS, U., TUBARO, L., SCHAEFER, W., WAGNER, H. **1991**, Immunologic active polysaccharides. Part 8. Immunologically active metallic ion-containing polysaccharides of *Arnica montana* cell cultures, *Phytochemistry*, 30 (4), 1141-1145.
- RAJENDRAN, V., JOSEPH, T. **1996**, Reappraisal of dopaminergic aspects of *Mucuna pruriens* and comparative profile with L-DOPA on cardiovascular and central nervous system in animals, *Indian Drugs*, 33 (9), 465-472.
- RAJESHKUMAR, N. V., KUTTAN, R. **2000**, *Phyllanthus amarus* extract administration increases the life span of rats with hepatocellular carcinoma, *J. Ethnopharm.*, 73, 215-219.
- RIDER, C. C. **1997**, The potential for heparin and its derivatives in the therapy and prevention of HIV-1 infection, *Glycoconjugate J.*, 14 (5), 639-642.
- ROESSNER, D., KULICKE, W.-M. **1994**, On-line coupling of flow field-flow fractionation and multi-angle laser light scattering, *J. Chromatogr. A*, 687, 249-258.

- ROTH, L., DAUNDERER, M. & KORMANN, K. **1994**, Giftpflanzen - Pflanzengifte, EcoMed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG, Landsberg, 499-500.
- RYDEN, P. C. I., SELVENDRAN, R. **1989**, Investigation of structural features of the pectic polysaccharides of onion by ^{13}C -NMR-spectroscopy, *Carbohydr. Res.*, 185, 233-237.
- SALIH, H., HUSFELD, L., ADAM, D. **1997**, Inhibitory effect of heparin on neutrophil phagocytosis and burst production using a new whole-blood cytofluorometric method for determination, *Eur. J. Med. Res.*, 2 (12), 507-513.
- SANTOS, A., DE CAMPOS, R. O. P., MIGUEL, O., FILHO, V., SIANI, A. C., YUNES, R., CALIXTO, J. **2000**, Antinociceptive properties of extracts of new species of plants of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae), *J. Ethnopharm.*, 72, 229-238.
- SANTRA, D. K.; MAJUMDAR, D. N. **1953**, *Mucuna pruriens*. II. Isolation of water-insoluble alkaloids, *Indian J. Pharm.*, 15, 60-61.
- SAPHIRE, A.C., Bobhardt, M.D., Gallay, P.A. **1999**, Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans, *EMBO J.*, 18 (23), 6771-6785.
- SAULNIER, L., BRILLOUET, J. **1988**, Structural studies of pectic substances from the pulp of grape berries, *Carbohydr. Res.*, 182, 63-78.
- SCHAEFFER, D., KRYLOV, V. **2000**, Anti-HIV activity of extracts and compounds from Algae and Cyanobacteria, *Ecotox. Environm. Safety*, 45, 208-228.
- SCHAUERTE, A. **1998**, Partialsynthetische Heparinoide aus Polysacchariden natürlichen Ursprungs, Dissertation, Universität Regensburg.
- SCHNEIDER, W. **1974**, Pflanzliche Drogen - Lexikon der Arzneimittelgeschichte, Band V/2, GOV-Verlag, Frankfurt.
- SCHÖLLHORN, C. **1994**, Strukturchemische und immunologische Untersuchungen von Polysacchariden aus *Withania somnifera* (L.) DUNAL und Untersuchungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung von Polysacchariden aus *Echinacea purpurea*-Zellsuspensionskulturen, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- SCHOLZ, E. **1994**, Pflanzliche Gerbstoffen – Pharmakologie und Toxikologie, *DAZ*, 34, 17-29.

- SCHWARTNER, C., BORS, W., MICHEL, C., FRANCK, U., MUELLER-JAKIC, B., NENNINGER, A., ASAKAWA, Y., WAGNER, H. **1995**, Effect of marchantins and related compounds on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase and their antioxidant properties: a structure activity relationship study, *Phytomedicine*, 2 (2), 113-117.
- SCHWARTNER, C. **1996**, Entzündungshemmende und antioxidative Wirkstoffe aus *Rumex acetosa* L. und andere Arzneipflanzen, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- SELVENDRAN, R., STEVENS, B. **1986**, Applications of mass spectrometry for the examination of pectic polysaccharides, *Gas chromatography / mass spectrometry*, Springer-Verlag, Berlin.
- SENDL, A., MULINACCI, N., VINCIERI, F. F., WAGNER, H. **1993**, Anti-inflammatory and immunological active polysaccharide of *Sedum telephium*, *Phytochemistry*, 34 (5), 1357-1362.
- SHEAD, A., VICKERY, K., MEDHURST, R., FREIMAN, J., COSSART, Y. **1990**, Neutralization but not cure of duck hepatitis B by Australian *Phyllanthus* extracts, Abstrakt 602, *The 1990 international symposium on viral hepatitis and liver disease*, Houston, Texas.
- SHIMIZU, N., TOMODA, M., GONDA, R., KANARI, M., KUBOTA, A. **1989**, An acidic polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the roots and rhizomes of *Saposhnikovia divaricata*, *Chem. Pharm. Bull.*, 37 (11), 3054-3057.
- SHIMIZU, N., TOMODA, M. **1985**, Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of alditol-form oligosaccharides having a fundamental structure units of the malvaceae mucilages and a related polysaccharide, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 5539-5542.
- SIDDHURAJU, P., VIJAYAKUMARI, K., JANARDHANAN, K. **1996**, Chemical composition and protein quality of the little-known legume, velvet bean (*Mucuna pruriens* (L.) DC.), *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2636-2641.
- SIERAKOWSKI, M.-R., GORIN, P., REICHER, F., CORREA, J. B. **1987**, Some structural features of a heteropolysaccharide from the leaves of the cactus *Pereskia aculeata*, *Phytochemistry*, 26 (6), 1709-1713.

- SINGH, R. B. **1999a**, Water soluble polysaccharide from garhwal region flora of *Mucuna pruriens* Bak. seeds, *Orient. J. Chem*, 15 (1), 187-188.
- SINGH, R. B. **1999b**, Periodate degradation of *Mucuna pruriens* Bak. seeds polysaccharide, *Acta Cienc. Indica. Chem.*, 25 (2), 27-28.
- SINGH, R. B. **2000**, Graded hydrolytic studies of *Mucuna pruriens* Bak seed polysaccharides, *Orient. J. Chem*, 16 (2), 339-341.
- SOMANABANDHU, A., NITAYANGKURA, S., MAHIDOL, C., RUCHIRAWAT, S., LIKHITWITAYAWUID, K., SHIEH, H., CHAI, H., PEZZUTO, J., CORDELL, G. **1993**, ¹H- and ¹³C-NMR assignments of phyllanthin and hypophyllantin: lignans that enhance cytotoxic responses with cultured multidrug-resistant cells, *J. Nat. Prod.*, 56, 233-239.
- SRIVASTAVA, V. K., SONDEHEIMER, S., SCHUERCH, C. **1980**, Synthesis and characterization of methyl 6-O-β-D-galactopyranosyl-β-D-galactopyranoside and methyl O-β-D-galactopyranosyl-(1→6)-O-β-D-galactopyranosyl-(1→6)-β-D-galactopyranoside, *Carbohydr. Res.*, 86, 203-214.
- SRIVIDYA, N., PERIWAL, S. **1995**, Diuretic, hypotensive and hypoglycemic effect of *Phyllanthus amarus*, *Ind. J. Exp. Biol.*, 33, 861-864.
- STEGLICH, W., FUGMANN, B., LANG-FUGMANN, S. **1997**, Römpp-Lexikon Naturstoffe, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- STENBERG, V. I., BOULEY, M. G., KATZ, B. M., LEE, K. J., PARMAR, S. S. **1990**, Negative endocrine control system for inflammation in rats, *Agents and Actions*, 29 (3-4), 189-195.
- STUPPNER, H. **1985**, Chemische und immunologische Untersuchungen von Polysacchariden aus der Gewebekultur von *Echinacea purpurea* (L.) Moench, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- SUBBU, V. **1967**, Pharmacological evaluation of a glucoside obtained from the plant *Vitis quadrangularis*, *Ind. J. Physiol. Pharmacol.*, 12, P15.
- SUBBU, V. **1970**, Mechanism of action of Vitis glucoside on myocardial tissue, *Ind. J. Med. Sci.*, 9, 400-402.
- SUN, H. H., WOOTTEN, J. B., RYAN, W. S., BOKELMAN, G. H., AMAN, P. **1987**, Structural characterization of a tobacco rhamnogalacturonan, *Carbohydr. Polym.*, 7 (2), 143-158.

- SUN, X., MATSUMOTO, T., YAMADA, H. **1991**, Effects of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurum falcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice, *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 690-704.
- SWEET, D., SHAPIRO, R., ALBERSHEIM, P. **1975**, Quantitative analysis by various GLC response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates, *Carbohydr. Res.*, 40, 217-225.
- SZALAY, S. **1997**, Pharmakologische Modulation des "oxidative burst" aktivierter neutrophiler Granulozyten in Anwesenheit von anoxischen Kardiomyoceten, Dissertation, Justus-von-Liebig Universität, Gießen.
- TAYLOR, R. C. H. **1972**, Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups, *Biochemistry*, 8, 1383-1388.
- THEWS, G., MUTSCHLER, E., VAUPEL, P. **1999**, Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart.
- THYAGARAJAN, S. P., THIRUNEELAKANTAN, K., SUBRAMANIAN, S., SUNDARAVELU, T. **1982**, In vitro inactivation of HBsAg by *Eclipta alba* Hassk. and *Phyllanthus amarus* Linn., *Ind. J. Med. Res.*, 76, 124-130.
- THYAGARAJAN, S. P., SUBRAMANIAN, S., THIRUNALASUNDARI, T., VENKATESWARAN, P., BLUMBERG, B. S. **1988**, Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus, *Lancet*, 1, 764-766.
- TOMODA, M., SHIMIZU, N., GONDA, R., KANARI, M., YAMADA, H., HIKINO, H. **1990**, Anti-complementary and hypoglycemic activities of the glycans from the seeds of *Malva verticillata*, *Planta Med.*, 56 (2), 168-170.
- TOMODA, M., OHARA, N., GONDA, R., SHIMIZU, N., TAKADA, K., SATOH, Y., SHIRAI, S. **1992**, An acidic polysaccharide having immunological activities from the rhizome of *Cnidium officinale*, *Chem. Pharm. Bull.*, 40 (11), 3025-3029.
- TOMODA, M., MATSUMOTO, K., SHIMIZU, N., GONDA, R., OHARA, N. **1993**, Characterization of a neutral and an acidic polysaccharide having immunological activities from the root of *Paeonia lactiflora*, *Biol. Pharm. Bull.*, 16 (12), 1207-1210.

- TOMODA, M., OHARA, N., SHIMIZU, N., GONDA, R. **1994**, Characterization of a novel heteroglycan from the rhizome of *Cnidium officinale* exhibiting high reticuloendothelial system-potentiating and anti-complementary activities, *Biol. Pharm. Bull.*, 17 (7), 973-976.
- TOMODA, M., GONDA, R., SHIMIZU, N., OHARA, N. **1994**, Characterization of an acidic polysaccharide having immunological activities from the tuber of *Alisma orientale*, *Biol. Pharm. Bull.*, 17 (5), 572-576.
- UDUPA, K., PRASAD, G. **1964**, Biomechanical and calcium⁴⁵ studies on the effect of *Cissus quadrangularis* in fracture repair, *Ind. J. Med. Res.*, 5, 480-487.
- UDUPA, K., PRASAD, G. **1964**, Further studies on the effect of *Cissus quadrangularis* in accelerating fracture healing, *Ind. J. Med. Res.*, 52 (1), 26-35.
- UDUPA, K., PRASAD, G., SEN, S. **1965**, The effect of phyto-genic anabolic steroid in the acceleration of fracture repair, *Life Sci.*, 4, 317-327.
- UNANDER, D., WEBSTER, G., BLUMBERG, B. S. **1991**, Uses and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): a compilation. II. the subgenus *Phyllanthus*, *J. Ethnopharm.*, 34, 97-133.
- USUI, T., YAMAOKA, N., MATSUDA, K., TUZIMURA, K., SUGIYAMA, H., SETO, A. **1973**, ¹³C NMR spectra of glucobioses, glucotrioses, and glucans, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1, 2425-2432.
- VAIDYA, R. A., SHETH, A. R., ALOORKAR, S. D., REGE, N. R., BAGIDIA, V. N., DEVI, P. K., SHAH, L. P. **1978**, The inhibitory effect of the cowhage plant-*Mucuna pruriens*- and L-DOPA on chlorpromazine-induced hyperprolactinemia in man, *Neurology (India)*, 26 (4), 177-178.
- VENKATARAMAN, G., SHRIVER, Z., RAMAN, R., SASISEKHARAN, R. **1999**, Sequencing complex polysaccharides, *Science*, 286 (15), 537-542.
- VLIETINCK, A. J., De BRUYNE, T., APERS, S., PETERS, L. A. **1998**, Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection, *Planta Med.*, 64, 97-109.

- VOGL, H. **1996**, Galaktansulfate als potentielle Angiogeneseinhibitoren, Dissertation, Universität Regensburg.
- WAGNER, H., PROKSCH, A., RIESS-MAURER, I., VOLLMAR, A., ODENTHAL, S., STUPPNER, H., JURCIC, K., LE TURDU, M., FANG, J. **1985**, Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglykane) aus höheren Pflanzen, *Arzneimittelforschung*, 35 (II) (7), 1069-1075.
- WAGNER, H., STUPPNER, H., SCHAEFER, W., ZENK, M. **1988**, Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures, *Phytochemistry*, 27 (1), 119-26.
- WAGNER, H., JURCIC, K. **1991**, Assays for immunomodulation and effects on mediators of inflammation, *Methods in plant biology*, Academic Press Limited, New York, 6, 195-217.
- WAKSCHULL, E., BRUNKE-REESE, D., LINDEMUTH, J., FISETTE, L., NATHANS, R., CROWLEY, J., TUFTS, J. C., ZIMMERMANN, J., MACKIN, W., ADAMS, D. S. **1999**, PGG-glucan, a soluble β -(1,3)-glucan, enhances the oxidation burst response, microbicidal activity, and activates and NF- κ B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid β -(1,3)-glucan, *Immunopharmacol.*, 41 (2), 89-107.
- WEBSTER, G. L. **1958**, A monographic study of the west Indian species of *Phyllanthus*, *J. Arnold Arboretum*, 27, 90-212.
- WHITE, R. J. **1997**, FFF-MALS a new tool for the characterization of polymers and particles, *Polym. Int.*, 43, 373-379.
- WINTER, C. A., RISLEY, E. A., NUSS, G. W. **1962**, Carrageenan-induced edema in hind paw of the rats as an assay for antiinflammatory drugs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111, 544-547.
- WITTGREN, B., WAHLUND, K.-G. **1997**, Fast molecular mass and size characterization of polysaccharides using asymmetrical flow field-flow fractionation-multiangle light scattering, *J. Chromatogr. A*, 760, 205-218.
- WITVROUW, M., DE CLERCQ, E. **1997**, Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs, *Gen. Pharmacol.*, 29 (4), 497-511.

- WOERDENBAG, H. J., PRAS, N., FRIJLINK, H. W., LERK, C. F., MALINGRE, T. M. **1990**, Cyclodextrin-facilitated bioconversion of 17- β -estradiol by a phenoloxidase from *Mucuna pruriens* cell cultures, *Phytochemistry*, 29 (5), 1551-1554.
- XU, H.X., WAN, M., DONG, H., PAUL, P.-H., FOO, L. **2000**, Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1, *Biol. Pharm. Bull.*, 23 (9), 1072-1076.
- YAMADA, H., OTSUKA, Y., OMURA, S. **1986**, Structural characterization of anti-complementary polysaccharides from the leaves of *Artemisia princeps*, *Planta Med.*, 4, 311-314.
- YAMADA, H., RA, K., KIYOHARA, H., CYONG, J., YANG, H. C., OTSUKA, Y. **1988**, Characterization of anti-complementary neutral polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum*, *Phytochemistry*, 27 (10), 3163-3168.
- YAMADA, H., RA, K., KIYOHARA, H., CYONG, J., OTSUKA, Y. **1989**, Structural characterization of an anti-complementary pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L., *Carbohydr. Res.*, 189, 209-226.
- YAMADA, H., KIYOHARA, H. **1989**, Chemical properties and anticomplementary activities of polysaccharide fractions from roots and leaves of *Panax ginseng*, *Abstr. Chin. Med.*, 3, 104.
- YAMADA, H., HIRANO, M., KIYOHARA, H. **1991**, Partial structure of an anti-ulcer pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. - Part II, *Carbohydr. Res.*, 219, 173-192.
- YAMAMOTO, N. **1990**, Inhibition of HIV-1 infectivity with curdlan sulfate *in vitro*, *Biochem. Pharmacol.*, 39 (4), 793-797.
- YANAGI, M., UNOURA, M., KOBAYASHI, H., HATTORI, N., MURAKAMI, S. **1989**, Inhibitory effect of an extract from *Phyllanthus niruri* on reaction of endogenous HBV-DNA polymerase and other DNA synthetases, *abstracts of papers presented at the 1989 meeting on hepatitis B viruses*, Sept. 25-28, 77.
- YANG, S. S., CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., BADER, J. P. **2001**, Natural product-based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program, *J. Nat. Prod.*, 64, 265-277.

- YEH, S. F., HONG, C. Y., HUANG, Y. L., LIU, T. Y., CHOO, K. B., CHOO, C. K. **1993**, Effect of an extract from *Phyllanthus amarus* on hepatitis B surface antigen gene expression in human hepatoma cells, *Antiviral Res.*, 20, 185-192.
- YOSHIDA, T., OKUDA, T. **1980**, ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of corilagin and geraniin, *Heterocycles*, 14 (11), 1743-1749.
- ZHANG, F., SUN, D., LI, M. **1995**, Preparation of Astragalus polysaccharide and its therapeutic effect on hepatitis, *Yaowu Shengwu Jishu*, 2 (2), 26-28.
- ZHAO, J. F., KIYOHARA, H., YAMADA, H., TAKEMOTO, N., KAWAMURA, H. **1991**, Heterogeneity and characterization of mitogenic and anti-complementary pectic polysaccharide from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch et DC., *Carbohydr. Res.*, 219, 149-172.

*Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. H. Wagner
am Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München*

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Wagner, danke ich sehr herzlich für die großzügige Unterstützung, die wissenschaftliche Förderung dieser Arbeit sowie für die Freiheit, am Institut uneingeschränkt und selbständig arbeiten zu können. Besonders möchte ich mich auch für die von ihm vermittelte Begeisterung für die Phytochemie bedanken.

Prof. Dr. A. Vollmar, Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der LMU-München, danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank:

Herrn Dr. P. Wolff und Frau Dr. S. Bladt für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen und wissenschaftlichen Fragen.

Frau Prof. A. Vollmar für die Überlassung des Laborplatzes und die Möglichkeit im Institut zu schreiben.

Herrn Prof. F. Bracher und J. Müller, beide am Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der LMU-München, für die Möglichkeit die GC-MS-Messungen durchzuführen (und mit Jörg die GC-MS-Analge `mal „vollständig“ auseinanderzunehmen).

Herrn Dr. Lerche und seinem gesamten Team für die Aufnahmen zahlreicher Kernresonanzspektren sowie Herrn Dr. W. Spahl, Department Chemie, für die Aufnahme der Massenspektren.

Herrn Dr. A. Subarnas, Department of Pharmacy – Indonesia, für die antiphlogistische Testung.

Herrn Prof. Dr. Adam. und Herrn Basiri, Abteilung für antimikrobielle Therapie und Infektionsimmunologie im Dr. von Haunerschen Kinderspital, und den Herrn Prof. R. Wagner und Dr. F. Notka, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

(RIMMH) - Universität Regensburg, für das Überlassen der pharmakologischen Ergebnisse.

Frau V. Rickl und Frau N. Gotovac für Ihre fotografische Hilfe und Tips bei der Bildbearbeitung.

Frau A. Stabenau und Herrn I. Presser für die technische Hilfe bei der Karl-Fischer-Titration und die Möglichkeit an der „wirklich großen“ Lyophile zu arbeiten, beide am Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der LMU-München.

Herrn A. Exner und Frau S. Hegendorf, Institut für Wasserchemie der TU-München, für die gute Zusammenarbeit und nette Atmosphäre bei der AF⁴.

Meinen Kolleginnen und Kollegen Frau K. Heider, Frau Ch. Mayr, Herrn Dr. L. Misra, Frau Dr. F. Offermann, Frau Dr. M. Perez, Frau Dr. B. Wiedemann, Frau Dr. C. Wirth und Herrn Dr. L. Yong für viele Anregungen und stete Hilfsbereitschaft.

Dem gesamten Arbeitskreis von Frau Prof. A. Vollmar für die nette Integration, die Tischtennispartien und die langen Abende im IV. + V. Stockwerk.

Meinen Laborkollegen und Freunden Nina, Stefan (& Jakob) Kraus, Susanne und Andreas Müller, Karin Niessen und Günter Raßer (als echten Statistiker) für ihre Hilfsbereitschaft, ihr großes fachliches Engagement und Ihre Freundschaft.

Besonders möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, fachliche Kompetenz und Freundschaft bei Rainer Samtleben bedanken - denn: „in allen Lebenslagen – Samtleben fragen !“

Von Herzen danke ich Ruth und meiner Familie, die mir immer zur Seite standen !

LEBENS LAUF

Per Erik Nerdinger,

geboren am 1. Februar 1971 in Augsburg.

Eltern	Randi Berit Nerdinger, geb. Hjelvik, Städtische Angestellte Winfried Nerdinger, Architekturhistoriker, Hochschulprofessor
Schul Ausbildung	1977-1981 Grundschule Taufkirchen 1981-1990 Gymnasium Unterhaching 1990 Abitur
Studium	1990-1996 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians- Universität (LMU) München 1990-1993 Grundstudium 1993 Vordiplom 1993-1996 Hauptstudium Wahlfach: Ökologische Chemie 1996 Diplom
Wissenschaftliche Tätigkeit	1996 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Kettrup am Institut für Ökologische Chemie, GSF-Forschungszentrum in Neuherberg bei München („Validierung eines zellulären Testsystems zu Ermittlung der 2,3,7,8- Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin-Äquivalente in Klär- schlamm“) 1997 Beginn der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. H. Wagner am Department Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung der Ludwig- Maximilians-Universität München