



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Phenolische Inhaltsstoffe in *Achillea millefolium* L. s.l. –
Phytochemische Charakterisierung und pharmakologische Testung

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Nora Geisz
Matrikel-Nummer:	9404413
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuerin:	Univ.Prof. Dr. Dr.h.c. Brigitte Kopp

Wien, am

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Univ.Prof. Dr. Brigitte Kopp sehr herzlich für die Ermöglichung der Durchführung meiner Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie, sowie die interessante Themenstellung und geschätzte wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Mag. Dr. Birgit Benedek für ihre gewissenhafte und engagierte Betreuung sowie ihre, in jeder Phase dieser Arbeit gewährte, freundliche und wohlwollende Unterstützung und große Hilfsbereitschaft.

Herrn ao.Univ.Prof. Dr. Walter Jäger und Frau ao.Univ.Prof. Dr. Theresia Thalhammer danke ich für die gute Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathophysiologie der Medizinischen Universität Wien und die Ermöglichung der pharmakologischen Untersuchungen.

Herrn Peter Wyskovsky möchte ich ganz besonders für die fachkundige Vorbereitung und Betreuung bei den Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber, sowie die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Frau Hortenzia Beres danke ich sehr herzlich für ihre wertvolle Hilfe bei der Aufbereitung des Pflanzenmaterials und ihre verlässlich gute Laune schon zu Beginn des Arbeitstages.

Ein großes Dankeschön auch allen Mitarbeitern der Abteilung sowie meinen Kolleginnen und Kollegen für die nette Zusammenarbeit und das heitere, durch stete Hilfsbereitschaft geprägte Arbeitsklima.

Bei all meinen Verwandten und Freunden möchte ich besonders herzlich für ihren Beistand danken, mit dem sie mich während meiner Studienzeit, größtenteils jedoch bereits wesentlich länger begleitet haben.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Mutter für die Ermöglichung des Studiums und ihre Unterstützung. Sie war immer für mich da und ist mir auch in schwierigen Zeiten verständnisvoll mit großer Geduld, Trost und Ermutigung zur Seite gestanden.

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	3
2. MATERIAL UND METHODEN	7
1.1 Phytochemischer Teil	7
1.1.1 Material.....	7
1.1.2 Extraktion und Probenvorbereitung	8
1.1.2.1 Extraktion des Drogenmaterials.....	8
1.1.2.2 Festphasenextraktion (SPE – solid phase extraction)	9
1.1.3 Herstellung der in den pharmakologischen Tests untersuchten „Säurefraktion IPRL“	11
1.1.3.1 Extraktion des Drogenmaterials.....	11
1.1.3.2 Festphasenextraktion (SPE – solid phase extraction)	12
1.1.4 Chromatographische Trenn- und Analysenmethoden.....	13
1.1.4.1 Dünnschichtchromatographie (DC)	13
1.1.4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	14
1.1.4.2.1 Charakterisierung der Vergleichssubstanzen.....	15
1.1.4.2.2 Quantifizierung der „Chlorogensäure-Fraktion“:.....	17
1.1.4.2.3 Quantifizierung der „Säure – Fraktion“:	18
1.1.4.2.4 Quantifizierung der „Flavonoid – Fraktion“:	18
1.1.4.2.5 Berechnung der quantifizierten Inhaltsstoffe:	19
1.2 Pharmakologischer Teil	20
1.2.1 Material.....	20
1.2.2 Modell der isoliert perfundierten Rattenleber (IPRL).....	22
3. ERGEBNISSE.....	24
1.3 Phytochemische Analytik.....	24
1.3.1 Allgemeines.....	24
1.3.2 HPLC-Analytik der durch Festphasenextraktion erhaltenen Fraktionen	26
1.3.2.1 „Chlorogensäure-Fraktion“ – Quantifizierung der Chlorogensäure	26
1.3.2.2 „Säure-Fraktion“ – Quantifizierung der DicaFFEoylchinasäuren und des Luteolin-7-O-glucuronids	27
1.3.2.3 „Flavonoid-Fraktion“ – Quantifizierung der Hauptflavonoide.....	30

1.3.3	Optimierung der Extraktionsmethode.....	31
1.3.3.1	Vorversuche	31
1.3.3.1.1	Ergebnisse und Auswertung	32
1.3.3.2	Auswahl des geeigneten Extraktionsmittels	38
1.3.3.2.1	Ergebnisse und Auswertung	38
1.3.4	Quantifizierung der Inhaltsstoffe aus einer Teezubereitung	41
1.3.4.1	Ergebnisse.....	43
1.3.5	Quantifizierung der für die pharmakologische Testung herangezogenen „Säurefraktion IPRL“	46
1.3.5.1	Ergebnisse.....	46
1.4	Pharmakologische Testung.....	47
1.4.1	Allgemeines.....	47
1.4.2	Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber	48
1.4.2.1	Vorversuche und Wahl der Testbedingungen	48
1.4.2.2	Ergebnisse.....	52
4.	DISKUSSION.....	57
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	67
6.	LITERATUR.....	69
	ANHANG	
	CURRICULUM VITAE	

1. Einleitung und Problemstellung

Die Schafgarbe (*Achillea millefolium* L. s.l.) aus der Familie der Asteraceae, heimisch in Europa, Nordasien und Nordamerika, ist als Arzneipflanze in der Volksmedizin sehr lange bekannt. Schon in der Antike wusste man von ihrer heilsamen Wirkung, wie aus Überlieferungen von Homer und Plinius hervorgeht. Achilles soll demnach den Umgang mit dem mildwirkenden Kraut zur Wundheilung bereits gekannt haben, was bei der späteren Zuordnung der beschriebenen Pflanzen Einfluss auf die Namensgebung genommen haben dürfte (Genaust, 1996).

Das Europäische Arzneibuch nennt *Achillea millefolium* L. als Stammpflanze für das Schafgarbenkraut oder *Millefolii herba.*, die Sammelart hingegen würde *Achillea millefolium* L. s.l. heissen. Die derzeitige Bezeichnung könnte auch eine hexaploide Kleinart meinen und ist demnach nicht ganz eindeutig. Verwendet werden die ganzen oder geschnittenen, getrockneten, oberirdischen Teile des blühenden Sprosses. Die Anwendung erfolgt einerseits innerlich in Form von wässrigen Auszügen, Extrakten oder Tinkturen, aber auch äußerlich als Umschlag, Spülung oder Bad. In der Homöopathie hingegen gelangt zur Herstellung der Urtinktur die Frischpflanze zur Verarbeitung.

Man schätzt die Schafgarbe aufgrund ihrer antimikrobiellen, abschwellenden und entzündungshemmenden, sowie auch gallensekretionssteigernden Eigenschaften (Kastner et al., 1995), weshalb als Hauptanwendungsgebiete entzündliche und krampfartige Magen-Darm-Erkrankungen, Appetitlosigkeit, Leber- und Gallenbeschwerden sowie Wundheilung gelten (Willuhn, 2002; Hänsel et al., 2004; Jurenitsch, 1992).

Die Vielfalt der Taxa des *Achillea millefolium*-Aggregates konnte nicht nur in ihren morphologischen und genetischen Unterschieden, sondern auch in der sehr verschiedenen chemischen Zusammensetzung und Verteilung ihrer Inhaltsstoffe festgestellt werden (Rauchensteiner et al., 2002; Willuhn, 2002).

Das ätherische Öl (derzeit wird im EuAB ein Mindestgehalt von 0,2% gefordert, es kann jedoch bis über 1% enthalten sein) und die Sesquiterpenlactone (EuAB: > 0,02% Proazulene, berechnet als Chamazulen) weisen einen antimikrobiellen und antifungalen Charakter auf (Simic et al., 2002), den Sesquiterpenen werden weiters spasmolytische und antiödematöse Eigenschaften zugeschrieben (Kastner et al., 1993).

Auch sind im Schafgarbenkraut noch Flavonoide, Phenolcarbonsäuren, Cumarine, Polyacetylene und in sehr geringen Mengen Betaine vertreten, wobei den Flavonoiden eine spasmolytische Wirkung nachgewiesen werden konnte (Lemmens-Gruber et al., 2006; Willuhn, 2002).

Zu den enthaltenen Phenolcarbonsäuren, einer im Pflanzenreich weit verbreiteten Inhaltsstoffgruppe, werden neben der Kaffeesäure auch Dicaffeoylchinasäuren sowie der Monoester Chlorogensäure gezählt. Ihnen werden allgemein entzündungshemmende, choleretische und hepatoprotektive, und antioxidative Wirkung nachgesagt.

Während entsprechende Prüfungen, welche die für die verbreitete Anwendung als Choleretikum verantwortlichen Wirkstoffe bestimmen könnten, für die Schafgarbe bisher noch fehlten, waren für die Artischocke (*Cynara scolymus* L.), die in Form von verschiedenen Zubereitungen hauptsächlich als Leber-Galle-Therapeutikum sowie zur Behandlung von dyspeptischen Beschwerden eingesetzt wird, und ihre phenolischen Inhaltsstoffe (Caffeoylchinasäure-Derivate und Flavonoide) bereits zahlreiche pharmakologische Untersuchungen erfolgt.

Darin konnten deren positive Effekte auf die Cholereuse (Kirchhoff et al., 1994), weiters auch hepatoprotektive und cholesterinsenkende Wirksamkeit (Pittler und Ernst, 1998; Wegener und Fintelmann, 1999) festgestellt werden.

Am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber (IPRL) wurde anhand von unterschiedlichen Fraktionen aus Artischocken-Zubereitungen der choleretische Effekt belegt für Cynarin im Speziellen, die Dicaffeoylchinasäuren im Allgemeinen, sowie für das Monoderivat Chlorogensäure, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß (Matuschowski, 1998).

Das Hauptinteresse dieser Arbeit richtete sich demnach der Untersuchung der in *Millefolii herba* vorkommenden DicaFFEoylchinasäuren.

Aufgrund der ebenfalls polaren Eigenschaften der Flavonoide und daraus resultierenden Überlagerungen bei Untersuchungen mit Kapillarelektrophorese und Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) war in Vorgängerarbeiten eine Methode zur Trennung dieser beiden Stoffgruppen basierend auf der Festphasenextraktion (SPE) erarbeitet worden (Wimmer, 2003; Trauner, 2004).

Der phytochemische Teil dieser Diplomarbeit sollte sich einerseits mit der Bestimmung der zur Erfassung der DicaFFEoylchinasäuren und Flavonoide best geeigneten Methanol-Wasser-Mischung als Extraktionsmittel befassen, andererseits war mittels SPE-HPLC-Quantifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe die Überprüfung der zur Drogenaufbereitung entwickelten Methode auf Wiederholpräzision beabsichtigt.

Die durch Anreicherung mittels Festphasenextraktion möglich gewordene gezielte Untersuchung der DicaFFEoylchinasäuren sollte auch Gegenstand der – in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathophysiologie der Medizinischen Universität Wien durchgeführten – ersten pharmakologischen Testung am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber sein. Cynarin, als wirksamkeitsbestimmende Komponente der Artischocke belegt, diente dabei als Positivkontrolle.

Somit sollten die in dieser Diplomarbeit vorgenommenen Untersuchungen einen weiteren, interessanten Beitrag zum Verständnis der Wirksamkeit der DicaFFEoylchinasäuren des *Achillea millefolium*-Aggregates leisten.

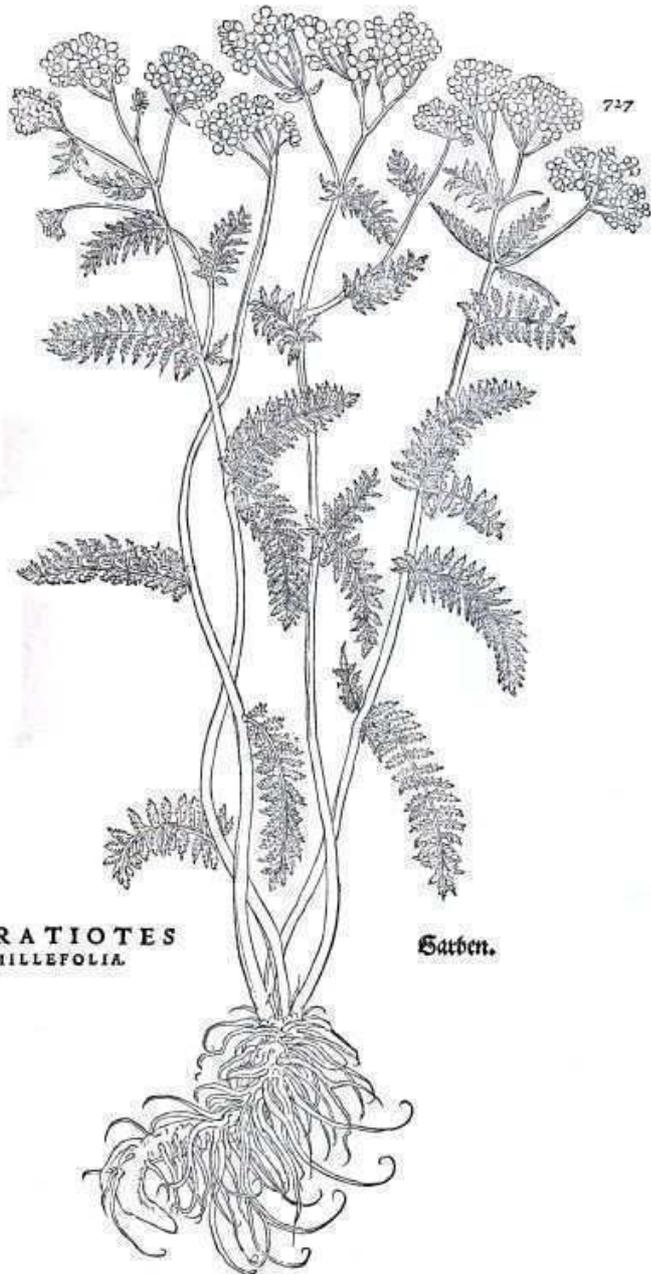
Teile dieser Arbeit gelangten bereits mit dem im Anhang befindlichen Artikel zur Veröffentlichung:

Benedek B., Geisz N., Jäger W., Thalhammer T., Kopp B. (2006): Choleric effects of yarrow (*Achillea millefolium* s.l.) in the isolated perfused rat liver; *Phytomedicine* 13 (2006) 702-706

LEONHARTVS FVCHSIYS
ÆTATIS SVÆ ANNO XLI



STRATIOTES
MILLEFOLIA



Sarben.

Abb. 1: Abbildungen aus dem 1542 veröffentlichten *Kräuterbuch* des Leonhart Fuchs (Österreichische Nationalbibliothek Wien): Der Verfasser des Textes, sowie die damals noch unter der Bezeichnung *Stratiotes millefolia* erwähnte Schafgarbe

2. Material und Methoden

1.1 Phytochemischer Teil

1.1.1 Material

❖ Pflanzenmaterial

Achillea millefolium var. roseo-alba L. (species cultivato)

Firma: Aboca Sansepolcro Italien; Kontrollnummer: 1D5787

Die Droge bestand aus den getrockneten, geschnittenen, oberirdischen Teilen der Pflanze, der Anbau war in Italien erfolgt.

❖ Chemikalien und Lösungsmittel

➤ Lösungsmittel

- Aqua dest.
- Ethanol p.a., Firma Neuber
- Methanol p.a., Firma J.T. Baker
- Dimethylsulfoxid (DMSO) p.a. (>99,5%), Firma Roth

➤ Mobile Phasen für DC und HPLC

- Acetonitril (HPLC Qualität), Firma Riedel-de Häen
- Ameisensäure konz. (98-100%), Firma Gatt-Koller
- Essigsäure p.a. (100%), Firma Roth
- Ethylacetat techn., Firma Roth

➤ Stationäre Phase für DC

- HPTLC-Platte 10x10 cm Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0,25 mm, Firma Merck

➤ Stationäre Phase für Festphasenextraktion (SPE)

- Mega Bond Elut® C18, 5 g Sorbens, 20 ml Reservoirvolumen, Firma Varian Incorporated, USA

➤ **Chemikalien und Reagenzien**

- Diphenylborsäure-β-ethyl-aminoester (= Naturstoffreagens A)
Firma Roth
- Polyethylenglykol 400, Firma Roth

❖ **Vergleichssubstanzen**

- Cynarin
Sequoia Research Products Ltd., Oxford, UK
Contr.No: 0403014671c ; (Reinheit > 96%)
- Chlorogensäure
Firma C. Roth
Chargennummer: 6385 0799398 ; (Reinheit > 96%)
- Luteolin-7-O-glucosid (HPLC)
Extrasynthèse, Genay, France
Lot: 04111604 [5373-11-5], (Reinheit > 98%)
- Luteolin-3',7-di-O-glucosid (HPLC)
Extrasynthèse, Genay, France
Lot 1: 04072304 [52187-80-1] ; (Reinheit > 95%)
Lot 2: 04111604 [52187-80-1] ; (Reinheit > 95%)

1.1.2 Extraktion und Probenvorbereitung

1.1.2.1 Extraktion des Drogenmaterials

◆ **Hydromethanolische Extrakte:**

Für die Untersuchungen im Rahmen der Vorproben kamen vier unterschiedlich zusammengesetzte Methanol-Wasser-Mischungen als Extraktionsmittel zum Einsatz. Dabei handelte es sich um die in Volumenprozent angegebenen Methanol-Konzentrationen 20%, 40%, 60% und 80%.

Um bei der Gewinnung der hydromethanolischen Auszüge möglichst hohe Ausbeuten zu erzielen, wurde die Methode der Zweifachextraktion gewählt.

Dafür wurde 1 g der pulverisierten Droge (nach ÖAB Sieb IV) in einem 250ml-Kolben mit 100 ml der jeweiligen Methanol-Wasser-Mischung durchmengt und 30 Minuten lang am Wasserbad unter Rückfluss erhitzt. Nach 20minütigem Abkühlen wurde der Überstand abgehoben, 10 min bei 3500 U/min zentrifugiert und anschließend in einen tarierten 250ml-Kolben übergeführt.

Für die zweite Extraktion wurden dem Drogenrückstand neuerlich 100 ml desselben Lösungsmittelgemisches zugesetzt und weitere 20 min unter Rückfluss erhitzt. Die abgekühlte Extraktlösung wurde möglichst quantitativ abgehoben, zur Abtrennung von Schwebstoffen vorsorgehalber zentrifugiert und mit dem ersten Auszug vereint.

Die Trocknung erfolgte zunächst am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei einer Badtemperatur von 40°C. Im Weiteren wurde der Rückstand bis zur Ermittlung des Droge-Extrakt-Verhältnisses (DEV) über Blaugel im evakuierten Exsiccator gelagert.

◆ Teezubereitung:

Entsprechend einer Angabe in der Literatur wurden für die Zubereitung eines Tees 2 g der fein geschnittenen Droge in einem Becherglas mit einer Tasse (150 ml) kochendem Trinkwasser übergossen, mit einem Uhrglas abgedeckt und 10 min stehen gelassen (Willuhn, 2002).

Der filtrierte und erkaltete Auszug wurde zur Trocknung lyophilisiert, der Rückstand eine Nacht im Exsiccator über Blaugel gelagert und zur Ermittlung des DEV gewogen.

1.1.2.2 Festphasenextraktion (SPE – solid phase extraction)

Zur Aufreinigung und Trennung des gewonnenen Extraktes in die drei nach ihren Hauptinhaltsstoffen benannten Fraktionen fiel unsere Wahl auf die Methode der Festphasenextraktion (SPE).

Die Entwicklung der best geeigneten Methode war in vorangegangenen Arbeiten geschehen und wurde mit den dort gewonnenen Erfahrungen übernommen.

Dafür kamen Kartuschen folgenden Typs zur Anwendung:

- Mega Bond Elut® C18, 5 g Sorbens, 20 ml Reservoirvolumen

Zu deren Konditionierung durchliefen mittels Anlegen von Unterdruck nacheinander zunächst zwei Reservoirvolumina (RV) Methanol p.a., im Anschluss daran zwei RV destilliertes Wasser mit einer Tropfgeschwindigkeit von ~8 ml/min die Kartusche.

Die wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben gewonnenen Extrakte wurden in jeweils 10,00 ml 20% MeOH (V/V) am Ultraschallbad vollständig gelöst und quantitativ auf die konditionierte Kartusche aufgebracht.

Bei einer Tropfgeschwindigkeit von ~8 ml/min wurde zunächst das als „Probendurchlauf“ bezeichnete Eluat in einem tarierten Kolben aufgefangen. Dieses enthielt das Restwasser des Konditionierungsschrittes sowie die Anteile der Extraktlösung, die die Kartusche nach Kontakt mit der stationären Phase durch den angelegten Unterdruck wieder verlassen hatten.

Zehnminütiges Trockensaugen im Anschluss diente dem Erzielen einer gleichmäßigen Verteilung und ausreichender Wechselwirkung der Extraktlösung mit dem Sorbens in der Kartusche.

Die erste Stufe der SPE begann mit dem Aufbringen von zwei RV destillierten Wassers. Das daraus resultierende wässrige Eluat wurde direkt mit dem leicht methanolischen Probendurchlauf vereinigt und als „Chlorogensäure-Fraktion“ (CF) bezeichnet.

Es folgte die Extraktion der „Säure-Fraktion“ mit sechs RV 20% MeOH. Auch diese wurde in einem tarierten Kolben bei konstanter Tropfgeschwindigkeit gesammelt.

Zuletzt wurde in selber Weise mit vier RV 80% MeOH die „Flavonoid-Fraktion“ gewonnen.

Tab. 1 Festphasenextraktion schematisch, unter Angabe der zur Konditionierung und Gewinnung der einzelnen Fraktionen erforderlichen Reservoirvolumina (RV = 20 ml)

Konditionierung	2 RV MeOH, 2 RV H ₂ O
Aufbringen der Probenlösung (10 ml)	
Probendurchlauf	10 min trocknen
Chlorogensäure - Fraktion	2 RV H ₂ O
Säure - Fraktion	6 RV 20% MeOH
Flavonoid - Fraktion	4 RV 80% MeOH

Die Trocknung der gesammelten Fraktionen erfolgte am Rotavapor unter vermindertem Druck und einer Badtemperatur von 40°C.

Die Trockengewichte der Fraktionen wurden abermals nach Lagerung über Blaugel im evakuierten Exsiccator ermittelt.

1.1.3 Herstellung der in den pharmakologischen Tests untersuchten „Säurefraktion IPRL“

In Hinblick auf die geplante pharmakologische Untersuchung der DicaFFEoylchinasäuren am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber waren am Department für Pharmakognosie dankenswerter Weise bereits im Vorfeld 1,3 g der „Säurefraktion IPRL“ vorbereitet worden, was aufgrund des relativ aufwändigen Extraktions- und Trennungsverfahrens für diese Arbeit große Zeitersparnis bedeutete.

Als größerer Ansatz und durch die Trocknung mittels Lyophilisation war die Herstellung dieser Anreicherung abweichend von den in Kapitel 1.1.2. beschriebenen Bedingungen geschehen und wird deshalb im Folgenden näher erläutert.

1.1.3.1 Extraktion des Drogenmaterials

Ausgehend von dem in Kapitel 1.1.1 genannten Pflanzenmaterial wurden 25 g der pulverisierten (Sieb IV) Droge zunächst mit 1500 ml 20% Methanol p.a. (V/V) 30 Minuten lang unter Rückfluss erhitzt, nach dem Abkühlen bei 3500 U/ min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert.

Der Rückstand wurde ein zweites Mal mit 1500 ml 20 Minuten lang unter Rückfluss erhitzt und nach dem Abkühlen zentrifugiert (vergleiche Kapitel 1.1.2.1).

Die Entfernung des Methanols aus den vereinigten Extrakten geschah am Rotavapor unter vermindertem Druck bei einer Badtemperatur von 40°C. Die weitere Trocknung der wässrigen Lösung erfolgte mittels Lyophilisation, die Lagerung des Extraktes über Blaugel im evakuierten Exsiccator. Bei einer Ausbeute von 9,1 g betrug das DEV 2,7 : 1.

1.1.3.2 Festphasenextraktion (SPE – solid phase extraction)

9,1 g des gewonnenen Extraktes wurden in 270 ml 20% Methanol (V/V) 10 Minuten am Ultraschallbad gelöst und in Portionen von jeweils 20,00 ml durch Festphasenextraktion aufgetrennt.

Dementsprechend war hier auch die Verwendung von größeren Kartuschen angebracht (ungleich Kapitel 1.1.2.2):

- Mega Bond Elut® C18, 10 g Sorbens, 60 ml Reservoirvolumen, Firma Varian Incorporated, USA

Die Tropfgeschwindigkeit war auch hier mit etwa 8 ml/min festgesetzt worden.

Tab. 2 Festphasenextraktion schematisch, unter Angabe der zur Konditionierung und Gewinnung der einzelnen Fraktionen erforderlichen Reservoirvolumina (RV = 60 ml)

Konditionierung	2 RV MeOH, 2 RV H ₂ O
Aufbringen der Probenlösung (20 ml)	
Probendurchlauf	10 min trocknen
Chlorogensäure - Fraktion	4 RV H ₂ O
Säure - Fraktion	4 RV 20% MeOH
Flavonoid - Fraktion	4 RV 80% MeOH

Die mit 20%igem Methanol erhaltenen Eluate wurden vereinigt und unter vermindertem Druck am Rotavapor durch Entfernen des Methanols eingengt. Die weitere Trocknung erfolgte wieder mittels Lyophilisation, die Lagerung des Fraktionsrückstandes über Blaugel im evakuierten Exsiccator.

Auf diese Weise konnten etwa 1,3 g der „Säurefraktion IPRL“ für die im Kapitel 1.4 ab Seite 47 beschriebenen pharmakologischen Tests gewonnen werden.

Für die Quantifizierung der darin enthaltenen Dicafeoylchinasäuren (siehe Kapitel 1.3.5) wurden lediglich 4,16 mg zur Herstellung einer etwa 0,4%igen Lösung entnommen.

1.1.4 Chromatographische Trenn- und Analysemethoden

1.1.4.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die analytische Dünnschichtchromatographie hatte in dieser Arbeit nur eine begleitende Funktion neben der Hochleistungsflüssigchromatographie. Sie war jedoch eine verlässliche und rasche Methode zur Kontrolle der mittels Festphasenextraktion (vgl. Kapitel 1.1.2.2) erzielten Auftrennung der Extraktlösungen.

Folgendes System fand dafür Anwendung (Wagner et al., 1983):

Stationäre Phase:

HPTLC - Platte 10 x 10 cm 60 F₂₅₄ , Schichtdicke 0,25 mm, Firma Merck

Mobile Phase:

Ethylacetat_{techn.} + HCOOH_{conc.} + CH₃COOH_{conc.} + H₂O (100 + 11 + 11 + 26)

Auftragevolumen:

Je nach Konzentration wurden 5 bis 10 µl strichförmig, mittels Mikropipette aufgetragen.

Entwicklung:

Die Platten wurden ohne Kammersättigung einmal entwickelt.

Laufstrecke:

8 cm

Detektion:

Nach dem Besprühen mit Naturstoff-Polyethylenglykol-Reagens (1%ige methanolische Lösung von Diphenylborsäure- β -ethyl-aminoester und 5%ige ethanolische Polyethylenglykol(PEG 400)-Lösung) erfolgte die Betrachtung der Fluoreszenz unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm.

Schon die direkte Betrachtung unter UV₃₆₆ zeigt blaue Zonierungen der Pflanzensäuren und gelbe der Flavonoide. Noch deutlicher erkennbar werden die Zonen nach Besprühen der Platte mit Naturstoffreagens.

1.1.4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Sämtliche in dieser Arbeit erwähnten analytischen Untersuchungen mittels HPLC wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

<u>Pumpe:</u>	Perkin Elmer (series 200)
<u>Detektor:</u>	Perkin Elmer UV/VIS detector (series 200)
<u>Autosampler:</u>	Perkin Elmer autosampler (series 200)
<u>Software:</u>	TotalChrom [®] (Perkin Elmer)
<u>Vorsäule:</u>	Hypersil BDS C18; Dimension: 4 x 4 mm, Partikelgröße: 5 μ m
<u>Säule:</u>	Hypersil BDS C18; Dimension: 250 x 4 mm, Partikelgröße: 5 μ m
<u>Fließmittel:</u>	Fließmittel A: Aqua dest. (pH 2,8; Zusatz von CH ₃ COOH _{conc}) Fließmittel B: Acetonitril (gleicher Säureanteil wie Fließmittel A)
<u>Flussrate:</u>	1,2 ml/min
<u>Volumen:</u>	10 μ l, Einspritzung per Autosampler

1.1.4.2.1 Charakterisierung der Vergleichssubstanzen

Die Methoden und Parameter der Gradientensysteme für bestmögliche Trennung und Auflösung wurden in einer parallel laufenden Arbeit erstellt und aus dieser übernommen (Benedek, 2007).

Für die Ermittlung der Reinheit der Vergleichslösungen und für die Eichungen kamen leicht abgewandelte und gekürzte Sequenzen zum Einsatz (vgl. dazu Tabelle 3 unten und Tabelle 6. auf Seite 18).

- Ermittlung der Reinheit von Chlorogensäure und Erstellung einer Eichgeraden

Für eine ~0,2%-ige Stammlösung lösten wir zunächst 1,90 mg Chlorogensäure in 1,00 ml 20% MeOH vollständig. Daraus wurden zunächst 5 Eichlösungen (EL 1 – EL 5) ansteigender Konzentration durch Verdünnung von 30 µl bis zu 150 µl auf jeweils 1,00 ml hergestellt (vgl. Tabelle 4, Seite 16).

Zur Ermittlung der Reinheit wurde EL 4 mittels des in Tabelle 3 auf dieser Seite beschriebenen HPLC-Gradientensystems 3mal bei einer Wellenlänge von 345 nm, jeweils 2mal bei 300 nm, 260 nm und 230 nm vermessen.

Der Mittelwert der bei 345 nm erhaltenen Prozentangaben der Peakflächen wurde mit 96,40% als Reinheit angenommen und zur Korrektur der Einwaage herangezogen.

Tab. 3: Fließmittelgradient für die HPLC-Analysen zur Bestimmung der Chlorogensäure sowie der Substanzreinheit von Cynarin

Dauer	Wasser (A)	Acetonitril (B)
8 min	84%	16%
8 min	84 --> 83%	16 --> 17%
1 min	83 --> 0%	17 --> 100%

Mithilfe dieser Ergebnisse konnte für die Chlorogensäure folgende Eichgerade erstellt werden (siehe Abbildung 2, nächste Seite):

Tab. 4: Eichlösungen der Chlorogensäure, hergestellt durch Verdünnungen einer ~ 0,2%igen Stammlösung. Korrektur der Einwaage entsprechend der Substanzreinheit, sowie Gegenüberstellung mit der mittleren Peakfläche in der Eichgeraden.

Chlorogensäure 1,9mg/ml Reinheit 96,40%			EICHGERADE	
Eichlösung	µl/ml	mg/ml	x (mg/ml) Korr. mg/ml	y (µ Peakfläche)
EL 1	30	0,057	0,05495	1167897
EL 2	50	0,095	0,09158	1964632
EL 3	80	0,152	0,14653	3207427
EL 4	100	0,190	0,18316	3980704
EL 5	150	0,285	0,27474	5982775

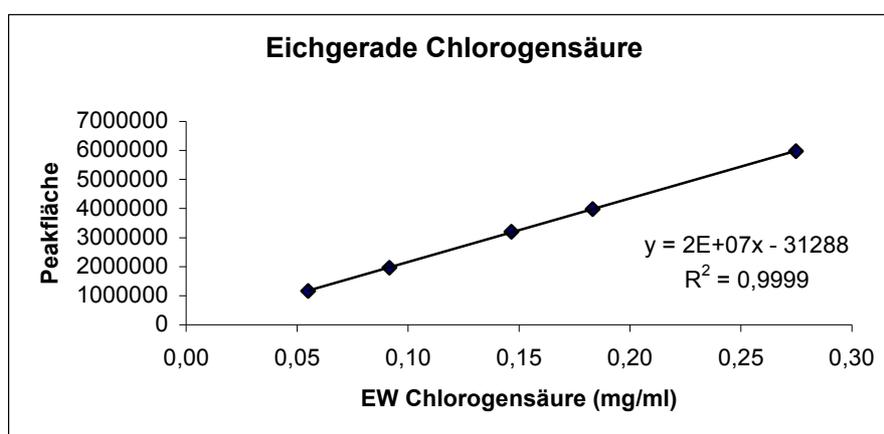


Abb. 2: Eichgerade für die Chlorogensäure, resultierend aus Vermessungen von fünf Eichlösungen ansteigender Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,27 mg/ml Prüflösung

- Ermittlung der Reinheit von Cynarin („Säure-Fraktion“):

Für eine ~ 0,1% Stammlösung von Cynarin wurden 5,20 mg der Substanz in 5,00 ml 20% MeOH vollständig gelöst. Zur Bestimmung der Reinheit wurden 200 µl davon mit demselben Lösungsmittel auf 1,00 ml weiter zu einer etwa 0,02%igen Lösung verdünnt, bei 13500 U/min zentrifugiert und in dem in Tabelle 3 auf Seite 15 beschriebenen System dreimal bei 345 nm, sowie jeweils zweimal bei 300 nm, 260 nm und 230 nm vermessen.

Die für die Quantifizierung des in der „Säure-Fraktion“ enthaltenen Luteolin-7-O-glucuronids erforderliche Ermittlung eines Korrekturfaktors gegenüber dem internen Standard Cynarin sowie die Erstellung einer Eichgeraden wird im Ergebnisteil in Kapitel 1.3.2.2 ab Seite 27 näher beschrieben.

- Übernommene Parameter für Luteolin-3',7-di-O-glucosid („Flavonoid-Fraktion“):

Für die ~0,1%-ige Stammlösung wurden 2,00 mg Luteolin-3',7-di-O-glucosid in wenig DMSO angelöst, mit MeOH im Ultraschallbad unter behutsamem Erwärmen vollständig gelöst und nach dem Abkühlen mit 80% MeOH auf 2,00 ml ergänzt.

Die Reinheit des Standards, diverse Eichgeraden, sowie die Korrekturfaktoren für die zu bestimmenden Substanzen (vgl. Tabelle 5) waren bereits unmittelbar vor Beginn der in dieser Arbeit durchgeführten Tests ermittelt worden (Benedek, 2007).

Tab. 5: Für die HPLC-Quantifizierung der Flavonoide übernommene Parameter

Reinheit ISTD:	
Luteolin-3',7-di-O-glucosid	95,60%
Korrekturfaktoren:	
Rutin	1,354
Luteolin-7-O-glucosid	0,731
Apigenin-7-O-glucosid	0,718
Luteolin-4'-O-glucosid	0,822
Apigenin	0,474

1.1.4.2.2 Quantifizierung der „Chlorogensäure-Fraktion“:

Zur Aliquotierung der gewonnenen „Chlorogensäure-Fraktion“ entsprechend der Linearität der Eichgeraden wurden die Rückstände (192 – 207 mg) in jeweils 4,00 ml 20% MeOH auf dem Ultraschallbad vollständig gelöst.

Danach wurden 100 µl davon (~ 5 mg des Rückstandes entsprechend) mit 20% MeOH auf 1,00 ml ergänzt, bei 13500 U/min 10 min lang zentrifugiert und anschließend bei 345 nm ebenfalls in dem in Tabelle 3 beschriebenen HPLC-Gradientensystem vermessen.

Als externer Standard für den Vergleich der einzelnen Peakflächen wurde hierbei ebenfalls die etwa 0,02%-ige Eichlösung 4 verwendet.

1.1.4.2.3 Quantifizierung der „Säure – Fraktion“:

Zur Aliquotierung der „Säure-Fractionen“ wurden die Rückstände (40 – 44 mg) in jeweils 4,00 ml 20% Methanol (MeOH) am Ultraschallbad vollständig gelöst. 500 µl davon (entspricht etwa 5 mg der Fraktion) wurden mit 200 µl der ~0,2%igen Standardstammlösung versetzt, auf 1,00 ml mit 20% MeOH ergänzt, 10 min bei 13500 U/min zentrifugiert und im Anschluss bei einer Wellenlänge von 345 nm in dem in Tabelle 6 angeführten Fließmittelsystem vermessen.

Tab. 6: Fließmittelgradient für die HPLC-Analysen der „Säure-Fraktion“ sowie zur Ermittlung eines Korrekturfaktors und Erstellung einer Eichgeraden für Luteolin-7-O-glucosid gegenüber Cynarin als internem Standard

Dauer	Wasser (A)	Acetonitril (B)
15 min	84%	16%
15 min	84 --> 82%	16 --> 18%
1 min	82 --> 0%	18 --> 100%
5 min	0%	100%

1.1.4.2.4 Quantifizierung der „Flavonoid – Fraktion“:

Zur Aliquotierung der gewonnenen „Flavonoid-Fraktion“ wurden die Rückstände (40 – 47 mg) in jeweils 2,00 ml 80% MeOH am Ultraschallbad vollständig gelöst. Je 500 µl davon wurden mit 200 µl der (~0,1%igen) Standardstammlösung versetzt, mit 20% MeOH auf 1,00 ml ergänzt und 10min bei 13500 U/min zentrifugiert.

Anschließend folgte die Vermessung bei 345 nm in dem in der folgenden Tabelle 7 angegebenen Gradientensystem

Tab. 7: Fließmittelgradient für die HPLC-Analysen der „Flavonoid-Fraktion“

Dauer	Wasser (A)	Acetonitril (B)
30 min	90 --> 83%	10 --> 17%
10 min	83 --> 60%	17 --> 40%
1 min	60 --> 0%	40 --> 100%
5 min	0%	100%

1.1.4.2.5 Berechnung der quantifizierten Inhaltsstoffe:

Aus den für die einzelnen Inhaltsstoffe sowie die Vergleichssubstanzen erhaltenen Peakflächen wurde mithilfe der folgenden Formel 1 der jeweilige prozentuelle Gehalt im Verhältnis zur eingesetzten Einwaage errechnet:

Formel 1: Berechnung des prozentuellen Gehalts an Inhaltsstoffen bei der Quantifizierung mittels internem Standard. **EW_{aliquot}**: vermessener Anteil der Einwaage (unter Berücksichtigung der Substanzreinheit des Standards); **KF**: Korrekturfaktor gegenüber der Vergleichssubstanz

$$\text{Gehalt \%} = \frac{\text{EW}_{\text{Standard aliquot}} \cdot \text{Peakfläche}_{\text{Substanz}} \cdot \text{KF} \cdot 100}{\text{EW}_{\text{Substanz aliquot}} \cdot \text{Peakfläche}_{\text{Standard}}}$$

1.2 Pharmakologischer Teil

1.2.1 Material

❖ Drogenmaterial

Bei dem hier eingesetzten Untersuchungsmaterial handelte es sich um die als „Säurefraktion IPRL“ bezeichnete Anreicherung der in *Millefolii herba* enthaltenen DicaFFEoylchinasäuren und des Luteolin-7-O-glucuronids, ausgehend von einem, aus dem in Kapitel 1.1.1 genannten Pflanzenmaterial gewonnenen, wässrig-methanolischen Extrakt. Die Herstellung dieser Fraktion wurde bereits in Kapitel 1.1.3 ab Seite 11 beschrieben.

❖ Vergleichssubstanz

- Cynarin
Sequoia Research Products Ltd., Oxford, UK
Contr.No: 0403014671c; (Reinheit > 96%)

❖ Chemikalien und Lösungsmittel

➤ **Chemikalien und Reagenzien**

- Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Kaliumchlorid (KCl)
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
- Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Natriumchlorid (NaCl)
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)
- Carbogen (93% O_2 / 7% CO_2)

➤ **Lösungsmittel**

- Aqua dest.
- Ethanol p.a.

❖ Versuchstiere

Die für die Leberperfusionen erforderlichen Organe entstammten ausschließlich männlichen Ratten des Typs „Sprague – Dawley“, bezogen vom *Institut für Versuchstierkunde und Genetik der Medizinischen Universität Wien*.

Das Alter der Tiere betrug etwa zwei Monate, das Lebendgewicht lag bei etwa 180 – 280 g, das Gewicht der isolierten Leber etwa bei 9 – 16 g.

Die Haltung erfolgte bei freiem Zugang zu Wasser und Nahrung in einem temperierten Raum mit kontrollierter Luftfeuchte unter 12-stündiger Lichteinwirkung. Die Tiere wurden unmittelbar vor dem operativen Eingriff zur Organentnahme mit Phenobarbital narkotisiert.

❖ Perfusionsmedium

Als Perfusionsmedium diente „Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer“ (KHB) in glukosefreier Form mit pH 7,4, in Anpassung an möglichst physiologische Bedingungen temperiert und begast.

Für die Herstellung von 5 Liter Perfusionslösung werden die in der folgenden Tabelle 8 angeführten Substanzmengen benötigt.

Tab. 8: Zur Herstellung von 5 Liter Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer (KHB) erforderliche Substanzmengen

Substanz	Einwaage für 5l KHB
NaCl	34,60 g
KCl	1,77 g
CaCl ₂	1,43 g
KH ₂ PO ₄	0,80 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,96 g
NaHCO ₃	10,50 g

Nach vollständigem Lösen der Chloridsalze in etwa 3,5 Liter Aqua _{dest.} werden die übrigen Substanzen zugesetzt und mit destilliertem Wasser auf 5,00 l ergänzt. Die Lösung hat absolut schwebstofffrei zu sein und wird jeweils frisch bereitet.

Um den, bei 37°C, pH 7,4 und der Einleitung von Carbogen, einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff (O₂) und 5% Kohlendioxid (CO₂), bestehenden

physiologischen Bedingungen zu entsprechen, war aufgrund des Temperaturverlustes während des Transportweges bis hin zum Organ ein Aufheizen auf 41°C und gleichzeitiges Zumischen von 93% O₂ und 7% CO₂ notwendig. Eine Verschiebung des pH-Wertes und das Ausfallen der Salze im Puffer konnten damit ausgeschlossen werden.

1.2.2 Modell der isoliert perfundierten Rattenleber (IPRL)

Bei diesem Modell handelt es sich um einen *ex vivo in vitro* Versuch an einer – dem narkotisierten Versuchstier auf operativem Wege entnommenen – Rattenleber, welche, von Perfusionslösungen unterschiedlicher Zusammensetzung passiert, über einen bestimmten Zeitraum hinsichtlich ihrer Funktionen beobachtet wird.

Als Perfusionsmedium diente „Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer“ in glucosefreier Form. Die Zusammensetzung und Herstellung der Lösung wurde im vorigen Kapitel 1.2.1 auf Seite 21 näher beschrieben.

Durch diese Pufferlösung, die unter möglichst physiologischen Bedingungen durch das Organ gepumpt wird, kann dessen Funktionsfähigkeit auch unter *ex vivo* Bedingungen erhalten werden. Mit einer Überlebensdauer von etwa 90 – 120 Minuten ist der zeitliche Rahmen für Untersuchungen an der isoliert perfundierten Leber jedoch beschränkt.

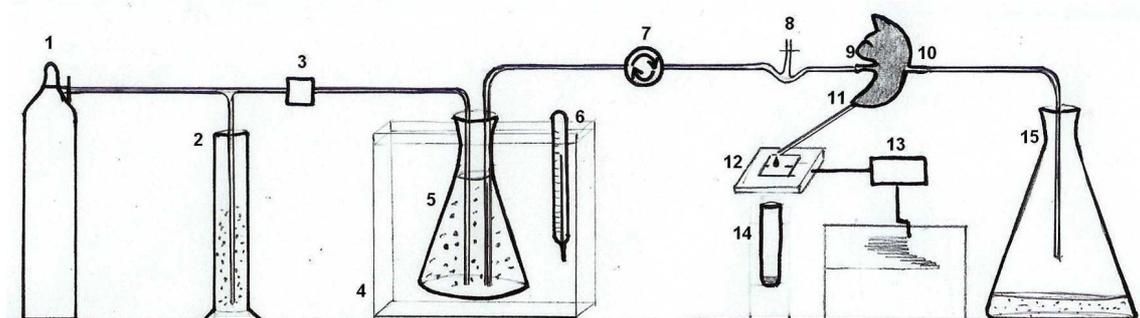


Abb. 3: Schema der hier durchgeführten Perfusion der isolierten Rattenleber 1: Gasbehälter mit Carbogen, 2: Gasdruckregulator, 3: Manometer, 4: Wasserbad, 5: Pufferreservoir bzw. Prüflösung, 6: Thermometer, 7: Pumpe, 8: Blasenfänger, 9: kanülierte Vena Portae der Leber, 10: kanülierte Vena cava inferior, 11: kanülierter Gallengang, 12: Durchflussmesser, 13: Schreiber, 14: Sammelgefäß, 15: Abfallbehälter

Die Koordination der Tests sowie der operative Eingriff am Versuchstier erfolgte durch Herrn Peter Wyskowsky vom *Institut für Pathophysiologie der Medizinischen Universität im Allgemeinen Krankenhaus Wien*.

Die Durchführung der Perfusionen erfolgte nach der Durchflussmethode, bei der das Medium die isolierte Leber nur einmal durchströmt.

Das entnommene Organ wurde in einer temperierten Kammer bei konstant 37°C mit einer Fließgeschwindigkeit von 35 ml/min über die kanülierte Vena portae mit dem Perfusionsmedium versorgt, welches über den ebenfalls kanülierten thorakalen Ast der Vena cava inferior wieder abgeleitet wurde. Die Einrichtung eines Blasenfängers unmittelbar vor dem Eintritt in die Leber sollte der Gefahr von Embolien durch Lufteintritt beim Wechsel zwischen den Perfusionslösungen vorbeugen. Für die Beobachtung der Choleresese war weiters die Kanülierung des Gallenganges erforderlich. Am Ende dieser abführenden Kunststoffkapillare bildeten sich Galletröpfchen bestimmten Ausmaßes. (Vergleiche auch Abbildung 3, gegenüberliegende Seite)

Den eigentlichen Untersuchungen der Prüflösungen ging eine 30minütige Vorperfusion mit reinem KHB voraus, die der Auswaschung von Blut, der Erholung vom Operationsstress sowie der Einstellung eines konstanten Ausgangsniveaus diente. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug während der gesamten Untersuchung konstant 35 ml/min. Für die Prüflösungen war eine Perfusionsdauer von 10 Minuten festgesetzt worden, dementsprechend wurden je 500 ml hergestellt. Für Vorperfusion und Auswaschphasen standen jeweils insgesamt 3500 ml reiner KHB bereit.

Der Gallenfluss wird definiert durch das Volumen Galle in Mikroliter (μl), das ein Gramm Leber (g_{Leber}) pro Minute freisetzt. Zu dessen Ermittlung wurde das zeitliche Intervall der vom Kanülenende abfallenden Tröpfchen über die Passage einer Lichtschranke registriert und mittels eines Schreibers graphisch dargestellt.

Unter den hier angeführten Bedingungen wurde durch Wiegen ein Gewicht von durchschnittlich 8 mg je abgefallenem Tröpfchen ermittelt und dieses mit einem Volumen von 8 μl gleichgesetzt.

3. Ergebnisse

1.3 Phytochemische Analytik

1.3.1 Allgemeines

Um für die in *Millefolii herba* enthaltenen phenolischen Inhaltsstoffe ähnlich vergleichende Untersuchungen durchführen zu können, wie es in vorangegangenen Arbeiten für die Sesquiterpenlactone und das ätherische Öl bereits geschehen war (Glasl, 1999; Rothwangl - Wiltchnigg, 2004), bedurfte es der Erstellung einer geeigneten Methode der Extraktion und Aufbereitung des Drogenmaterials und deren Validierung.

Neben der Monocaffeoylchinasäure Chlorogensäure (5-O-CCA) sind drei Dicaffeoylchinasäuren (DCCAs) sowie einige Flavonoide enthalten.

Aufgrund der unterschiedlichen Glykosidierung – es handelt sich vorwiegend um Mono-, und Diglucoside, teilweise auch um Glucuronide – zeigen die im Kraut der Schafgarbe auftretenden Flavonoide verhältnismäßig polare Eigenschaften. Ohne weitere Aufbereitung der Extraktlösungen käme es bei der hier gewählten Quantifizierungsmethode mittels HPLC zu nicht eindeutigen Ergebnissen aufgrund von Überlagerungen mit den DCCAs.

Eine Trennung der Dicaffeoylchinasäuren von den Flavonoiden zu erreichen war somit ein wesentlicher Schritt für die spätere Gehaltsbestimmung.

Als gute Möglichkeit dafür hat sich die Festphasenextraktion (SPE) erwiesen. Die Methodenentwicklung war in Vorgängerarbeiten geschehen und daraus übernommen worden (Nemetz, 2003; Trauner, 2004). Die Durchführung der Extraktzubereitung erfolgte – gleichbleibend für alle Versuche – wie in Kapitel 1.1.2.2 ab Seite 9 beschrieben.

Ausgehend von dieser Methode sollte nun der Einfluss des Extraktionsmittels auf die Zusammensetzung der Extrakte überprüft, und aus vier Methanol-Wasser-Mischungen die best geeignete ermittelt werden.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte verwendeten wir in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Drogenmaterial derselben Charge (siehe Kapitel 1.1.1).

Begleitend zur Festphasenextraktion wurden Dünnschichtchromatogramme (vgl. Abbildung 4 unten, Abbildung 16 Seite 42) angefertigt, bei denen auf der ersten Bahn die Extraktlösung direkt aufgetragen wurde.

Auf der zweiten Bahn lief der „Probendurchlauf“ (PDL), jener Anteil der Extraktlösung, der beim Trockensaugen die Kartusche durchwandert.

Das mit zwei Reservoirvolumina Wasser gewonnene Eluat wurde auf Bahn 3 aufgetragen, bezeichnet als „wässrige Fraktion“ (wF).

Entsprechend der jeweils angereicherten Inhaltsstoffe folgten die „Säure-Fraktion“ (SF) auf Bahn 4 und die „Flavonoid-Fraktion“ (FF) auf Bahn 5.

Diese nach der SPE erhaltenen Sammelfraktionen waren später Ausgangsmaterial für die Quantifizierung mittels HPLC.

Das Dünnschichtchromatogramm veranschaulicht die Effizienz der Festphasenextraktion bei der Auftrennung des Extraktes. Durch Besprühen der entwickelten Platten mit Naturstoffreagens A und Betrachtung unter $UV_{366\text{ nm}}$ zeigen die Caffeoylchinasäuren intensiv blaue Fluoreszenz, während die Flavonoide gelb-orange Zonierungen aufweisen.

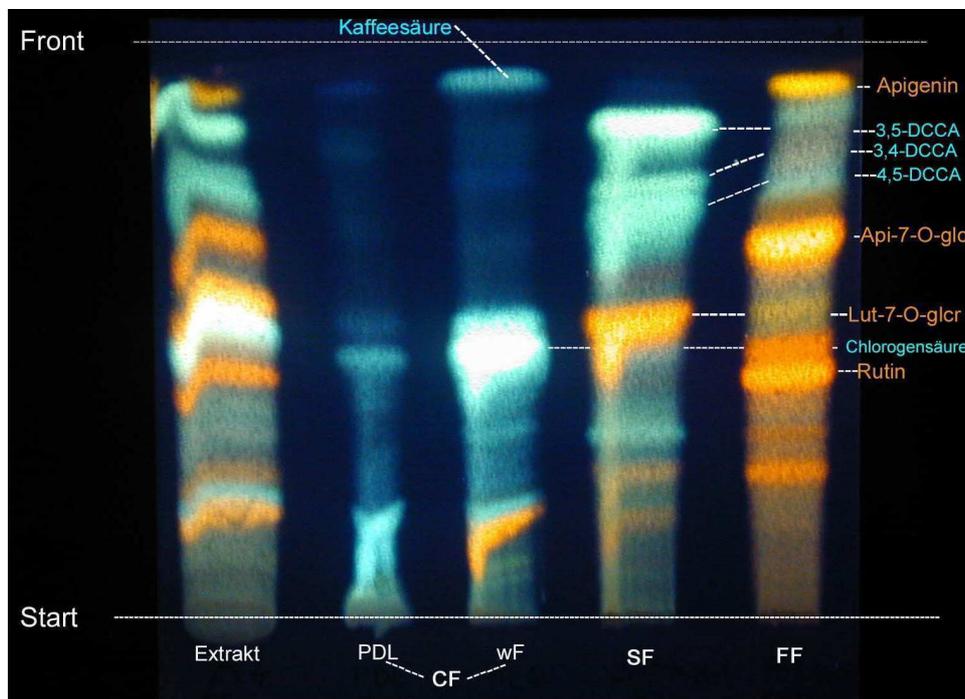


Abb. 4: Dünnschichtchromatogramm eines hydromethanolischen Extraktes (20% MeOH), sowie der einzelnen durch SPE erhaltenen Fraktionen. **CF:** Chlorogensäure-Fraktion, zusammengesetzt aus Probendurchlauf (PDL) und der wässrigen Fraktion (wF); **SF:** Säure-Fraktion; **FF:** Flavonoid-Fraktion

Aufgrund der ähnlichen Zusammensetzung schien eine Vereinigung des Probendurchlaufs (PDL) mit der „wässrigen Fraktion“ sinnvoll. Diese Sammelfraktion wurde entsprechend ihrer Hauptkomponente fortan zur „Chlorogensäure-Fraktion“ (CF) zusammengefasst.

1.3.2 HPLC-Analytik der durch Festphasenextraktion erhaltenen Fraktionen

1.3.2.1 „Chlorogensäure-Fraktion“ – Quantifizierung der Chlorogensäure

Diese erste, aus der Festphasenextraktion der hydromethanolischen Extrakte erhaltene Fraktion beinhaltete den Probendurchlauf und das wässrige Eluat. Wie im Dünnschichtchromatogramm (vgl. Abbildung 4 auf Seite 25) ersichtlich ist, wurden von dem Sorbens hier die Monocaffeoylchinasäure Chlorogensäure (5-O-Caffeoylchinasäure, 5-O-CCA), sowie ein offenbar sehr polares, bisher noch nicht zugeordnetes Flavonoid gelöst. Im Rahmen dieser Arbeit war eine Isolierung oder eine nähere Zuordnung dieser Substanz leider nicht möglich.

Für die Quantifizierung der in *Millefolii herba* enthaltenen Chlorogensäure wurde die HPLC-Analytik mittels der im Handel erhältlichen Reinsubstanz als externem Standard gewählt.

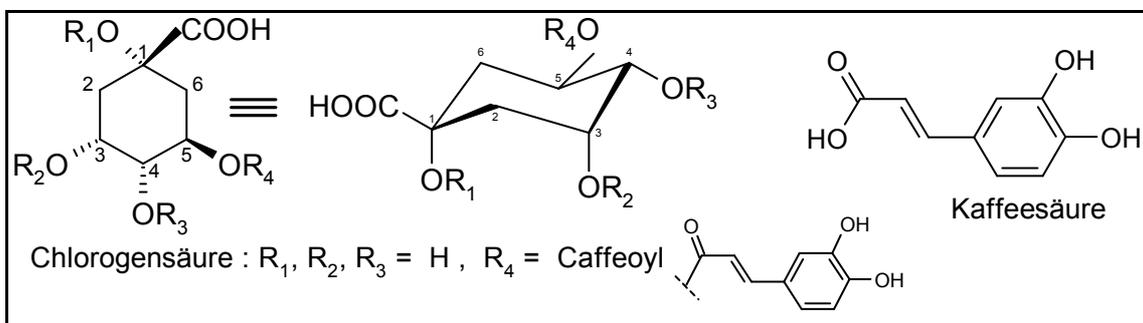


Abb. 5: Struktur der Chlorogensäure, einer Monocaffeoylchinasäure (5-O-CCA)

Da die Chlorogensäure in dem gewählten Gradientensystem bereits mit einer Retentionszeit von etwa 2,5 min aufschien, und in dieser Fraktion keine

weiteren hier relevanten Inhaltsstoffe auftraten, wurde für deren Quantifizierung ebenfalls die gekürzte, in Kapitel 1.1.4.2 für die Eichung und Ermittlung der Reinheit erstellte Methode verwendet (siehe Tabelle 3 auf Seite 15).

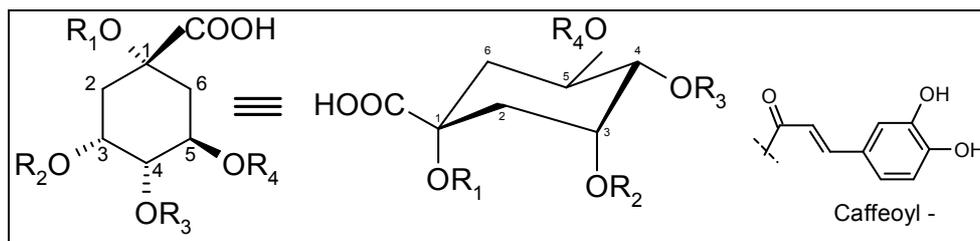
Als externer Standard diente eine etwa 0,02%-ige Lösung der Chlorogensäure

1.3.2.2 „Säure-Fraktion“ – Quantifizierung der Dicaffeoylchinasäuren und des Luteolin-7-O-glucuronids

Das zweite, bei der Festphasenextraktion mit 20% MeOH erhaltene Eluat enthält die drei Dicaffeoylchinasäuren 3,4 -, 3,5- und 4,5-DCCA sowie das sehr polare Flavonoid Luteolin-7-O-glucuronid. Es wird hier als „Säure-Fraktion“ bezeichnet.

Cynarin (1,3-DCCA) als weiteres Strukturisomer scheint in *Millefolii herba* nicht auf und eignet sich somit auch aufgrund der Verfügbarkeit im Handel als optimaler interner Standard für die Quantifizierung.

Die ähnlichen Eigenschaften, vor allem dasselbe Molekulargewicht, ließen bei der Quantifizierung die Annahme eines Korrekturfaktors von 1 für die einzelnen DCCAs zu, da eine experimentelle Bestimmung derselben aufgrund von unzureichend zur Verfügung stehenden, isolierten Materials nicht möglich war.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Cynarin	Caffeoyl -	Caffeoyl -	H	H
3,4-DCCA	H	Caffeoyl -	Caffeoyl -	H
3,5-DCCA	H	Caffeoyl -	H	Caffeoyl -
4,5-DCCA	H	H	Caffeoyl -	Caffeoyl -

Abb. 6: Struktur der Dicaffeoylchinasäuren aus *Millefolii herba* sowie der internen Standards Cynarin

Etwas komplizierter gestaltete sich die Quantifizierung des Luteolin-7-O-glucuronids. Für die Vermessung mit Cynarin als internem Standard musste diesem gegenüber zunächst ein Korrekturfaktor ermittelt werden.

Dafür wurde nun anstelle des Glucuronids, für das keine Reinsubstanz zum Vergleich vorlag, vorerst das Glucosid herangezogen.

Für eine Stammlösung von Luteolin-7-O-glucosid wurden 1,9 mg der Substanz mithilfe von DMSO als Lösungsvermittler in 1,00 ml MeOH p.a. vollständig gelöst.

100 µl davon wurden mit 20% MeOH auf 1,00 ml verdünnt, bei 13500 U/min zentrifugiert und wiederum mit derselben Methode und bei oben genannten Wellenlängen vermessen. Als Richtwerte für die Substanzreinheit dienten in beiden Fällen, wie auch schon bei der Chlorogensäure, die Mittelwerte der bei 345 nm erhaltenen Prozentangaben der Peakflächen der jeweiligen Substanz.

Für die Erstellung der Eichgeraden für Luteolin-7-O-glucosid (Abbildung 7 gegenüberliegende Seite) und die Ermittlung des Korrekturfaktors gegenüber dem Standard wurden fünf Eichlösungen (EL 1 – EL 5) mit gleich bleibender Konzentration an Cynarin und ansteigender Konzentration an Luteolin-7-O-glucosid hergestellt (siehe Tabelle 9, gegenüberliegende Seite).

Auch hier erfolgte die Vermessung bei 345 nm in dem im Methodenteil in TabelleTab. 66 auf Seite 18 angegebenen Gradientensystem. Unter Berücksichtigung der Reinheiten konnten mithilfe der folgenden Formel 2 aus den Peakflächen die Korrekturfaktoren für die jeweiligen Eichlösungen berechnet werden.

Aus deren Mittelwert ergab sich für das Luteolin-7-O-glucosid der Korrekturfaktor $KF = 0,850$.

Formel 2 Berechnung des Korrekturfaktors (KF) für Luteolin-7-O-glucosid

$$KF = \frac{EW_{Lut-7-O-glc} * Peakfläche_{Cynarin}}{EW_{Cynarin} * Peakfläche_{Lut-7-O-glc}}$$

Tab. 9: Eichlösungen ansteigender Konzentrationen an Luteolin-7-O-glucosid zur Ermittlung eines Korrekturfaktors gegenüber Cynarin als internem Standard sowie zur Erstellung einer Eichgeraden. Eichlösung 4 wurde weiters für die Bestimmung der Substanzreinheit vermessen.

Stamm-lösung	Cynarin	Lut-7-O-glucosid	Korrektur-faktor (KF)
	1,04 mg/ml	1,98 mg/ml	
Reinheit	96,14%	97,13%	
EL 1	200 µl	30 µl	0,890
EL 2	200 µl	50 µl	0,879
EL 3	200 µl	80 µl	0,826
EL 4	200 µl	100 µl	0,843
EL 5	200 µl	150 µl	0,810
			$\mu(KF) = 0,850$

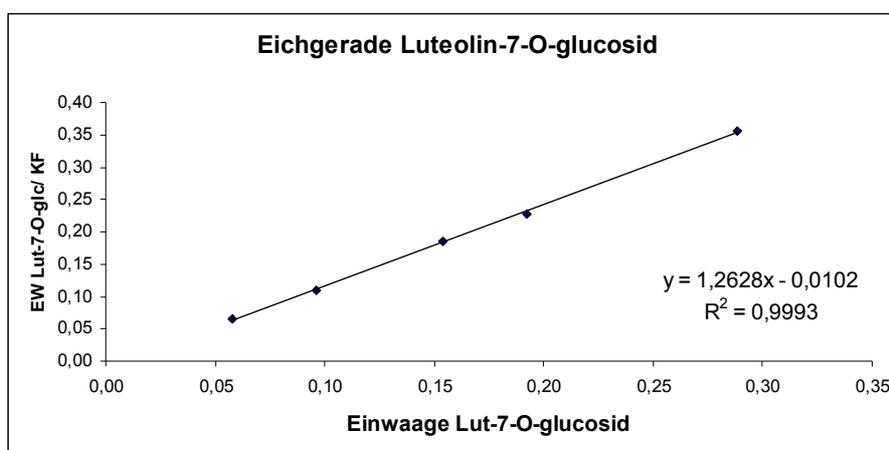


Abb. 7: Eichgerade für Luteolin-7-O-glucosid unter Berücksichtigung des jeweiligen Korrekturfaktors, resultierend aus Vermessungen von fünf Eichlösungen ansteigender Konzentrationen zwischen etwa 0,06 und 0,29 mg/ml Prüflösung gegenüber Cynarin als internem Standard

Die Umrechnung des Korrekturfaktors geltend für das Luteolin-7-O-glucuronid (Lut-7-O-gl) erfolgte anhand des Molekulargewichtes (MG) ausgehend vom Luteolin-7-O-glucosid.



Für die Quantifizierung des Luteolin-7-O-glucuronids wurde fortan dieser berechnete Korrekturfaktor $KF = 0,877$ gegenüber Cynarin herangezogen.

Die Quantifizierung der DicaFFEoylchinasäuren und des Luteolin-7-O-glucuronids wurde unter Einsatz einer 0,02%-igen Lösung von Cynarin als internem Standard nach der in Kapitel 1.1.4.2 in Tabelle 6 auf Seite 18 beschriebenen Methode durchgeführt.

Die Vermessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 345 nm.

Das Chromatogramm für die in der „Säure-Fraktion“ enthaltenen Inhaltsstoffe entsprach im Allgemeinen der Darstellung in Abbildung 8.

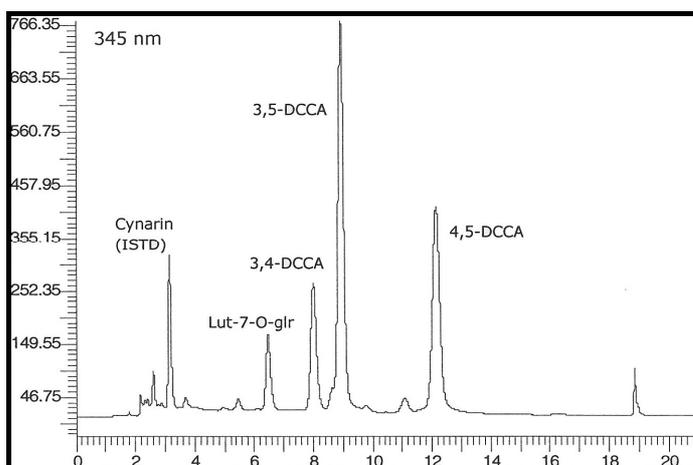


Abb. 8: Chromatogramm einer „Säure-Fraktion“ nach Vermessung im entsprechenden Gradientensystem bei 345 nm

1.3.2.3 „Flavonoid-Fraktion“ – Quantifizierung der Hauptflavonoide

Die als „Flavonoid-Fraktion“ bezeichnete dritte Fraktion im Rahmen der Festphasenextraktion wurde mit 80% MeOH eluiert.

In ihr sind die Flavonoide in Form der Aglyka, Quercetin, Apigenin und Luteolin, sowie einige Glykoside, darunter auch Rutin als Diglucosid enthalten.

Die beiden ebenfalls auftretenden Aglyka Quercetin und Luteolin den beim hier angewendeten Gradientensystem aufscheinenden Peaks eindeutig zuzuordnen gelang leider auch mittels Cochromatographie mit authentischen Vergleichsubstanzen nicht. Deshalb, und auch wegen ihres Vorkommens in nur sehr geringen Mengen findet die Quantifizierung dieser beiden Substanzen hier keine weitere Erwähnung.

Zur Quantifizierung der Flavonoide wurde der Probenlösung wieder ein interner Standard in Form einer 0,02%-igen Lösung von Luteolin-3',7-di-O-glucosid zugesetzt (siehe auch Kapitel 1.1.4.2, Seite 18).

Nach Vermessung in dem in Kapitel 1.1.4.2.4 auf Seite 18 beschriebenen Gradientensystem erhielten wir für die „Flavonoid-Fraktion“ Chromatogramme die dem in der folgenden Abbildung 9 entsprechen:

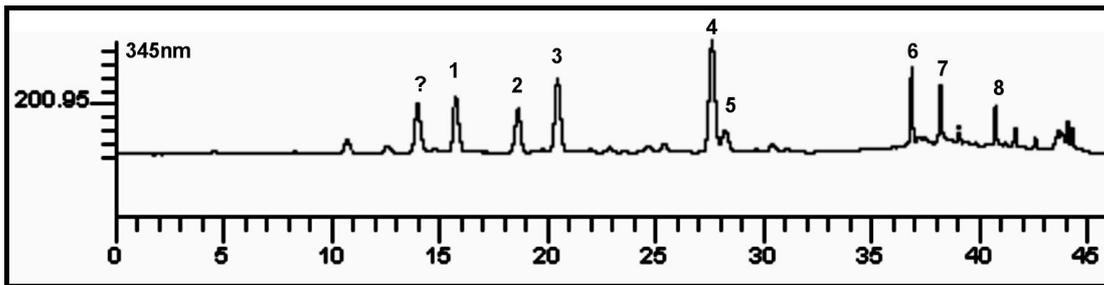


Abb. 9: HPLC-Chromatogramm der „Flavonoid-Fraktion“: 1: ISTD Lut-3',7-di-O-glc, 2: Rutin, 3: Lut-7-O-glc, 4: Api-7-O-glc, 5: Lut-4'-O-glc, 6: ?*Quercetin*?, 7: ?*Luteolin*?, 8: Apigenin

1.3.3 Optimierung der Extraktionsmethode

1.3.3.1 Vorversuche

Ausgehend von der in Kapitel 1.1.2.2 beschriebenen, auf Erkenntnissen aus früheren Arbeiten basierenden Methode der Extraktbearbeitung mittels Festphasenextraktion sollte hier das optimale Methanol-Wasser-Mischungsverhältnis ermittelt werden, das einerseits eine möglichst große Extraktausbeute erzielt, andererseits aber sowohl die polaren DicaFFEoylchinasäuren als auch die etwas apolareren, in wesentlich geringeren Mengen auftretenden Flavonoide ausreichend erfasst.

Bei den Vorversuchen wurden die Methanolkonzentrationen 20%, 40%, 60% und 80% (V/V) gewählt, für die Anzahl der Versuche $n = 2$ festgesetzt.

Die Extraktion erfolgte wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, die HPLC-Analytik entsprechend Kapitel 1.1.4.2.

Eine Quantifizierung der Chlorogensäure fand im Rahmen dieser Vorversuche noch nicht statt.

1.3.3.1.1 Ergebnisse und Auswertung

Die Ergebnisse und Erkenntnisse aus diesen Vorversuchen bestätigten die Vermutung, dass weder die sehr polare Mischung 20% Methanol noch die umgekehrte Variante mit 80% MeOH für eine möglichst erschöpfende Erfassung sowohl der DicaFFEoylChinasäuren als auch der Flavonoide optimal wären.

Wenn auch die Extraktion mit 20%igem Methanol die höchste Extraktausbeute brachte (das DEV lag hier bei 3,2 : 1 gegenüber 3,8 : 1 mit 80% MeOH), so waren die nach SPE-Extraktzubereitung und HPLC-Quantifizierung ermittelten Gehalte an Flavonoiden in diesen Auszügen doch erwartungsgemäß die niedrigsten.

Abhängig von der Polarität des Extraktionsmittels variierten auch die prozentuellen Anteile der einzelnen Fraktionen im Vergleich zur Extraktausbeute.

So machte die „Säure-Fraktion“ bei 20%igem Methanol noch mehr als 14% aus, lag jedoch unter 12% bei den Auszügen mit 80%igem MeOH.

Für die „Flavonoid-Fraktion“ galt Gegenteiliges. Mit knapp 16% bei 80% MeOH gegenüber nur 13% bei 20%MeOH wurde ihr Anteil am Extrakt ermittelt.

In allen Fällen stellte der Rückstand der „Chlorogensäure-Fraktion“ mit nahezu zwei Drittel der Extraktauswaage deren Hauptanteil dar.

Eine Übersicht der in den Vorversuchen erhaltenen Daten liefert Tabelle 10 auf der gegenüberliegenden Seite:

Tab. 10: Ergebnisse der Extraktion von einem Gramm Droge mit vier Methanol-Wasser-Gemischen ansteigender Polarität unter Angabe der Extraktauswaage, des Droge-Extrakt-Verhältnisses, der Fraktionsrückstände nach SPE-Aufreinigung und der in den einzelnen Fraktionen quantifizierten Substanzen (mit Ausnahme der Chlorogensäure)

PROBE	SAUREFRAKTION						FLAVONOIDFRAKTION					
	SF mg	Substanz	% in SF	mg in SF	% in Extr.	% in Droge	FF mg	Substanz	% in FF	mg in FF	% in Extr.	% in Droge
A (80%)	34,02	ISTD Cynarin					47,10	ISTD Lut-3',7-di-O-glc				
Extrakt mg	267,67	Lut-7-O-glr	4,23	1,44	0,54	0,14	Rutin	2,14	1,01	0,38	0,10	
DEV	3,8 : 1	3,4 DCCA	3,52	1,20	0,45	0,12	Lut-7-O-glc	1,84	0,87	0,32	0,09	
CF mg	159,45	3,5 DCCA	35,93	12,22	4,57	1,21	Api-7-O-glc	2,57	1,21	0,45	0,12	
SF mg	34,02	4,5 DCCA	5,12	1,74	0,65	0,17	Lut-4'-O-glc	0,55	0,26	0,10	0,03	
FF mg	47,10	Σ DCCAs	44,57	15,16	5,67	1,50	Apigenin	0,20	0,09	0,04	0,01	
							Σ Flavonoide	7,30	3,44	1,29	0,35	
B (80%)	27,99	ISTD Cynarin					38,67	ISTD Lut-3',7-di-O-glc				
Extrakt mg	271,33	Lut-7-O-glr	4,25	1,19	0,44	0,12	Rutin	2,17	0,84	0,38	0,10	
DEV	3,8 : 1	3,4 DCCA	3,52	0,99	0,33	0,09	Lut-7-O-glc	1,85	0,72	0,33	0,09	
CF mg	222,22	3,5 DCCA	36,58	10,24	4,77	1,26	Api-7-O-glc	2,76	1,07	0,49	0,13	
SF mg	27,99	4,5 DCCA	4,95	1,39	0,51	0,13	Lut-4'-O-glc	0,49	0,19	0,09	0,02	
FF mg	38,67	Σ DCCAs	45,05	12,61	5,61	1,48	Apigenin	0,21	0,08	0,04	0,01	
							Σ Flavonoide	7,48	2,89	1,33	0,35	
C (60%)	43,80	ISTD Cynarin					43,65	ISTD Lut-3',7-di-O-glc				
Extrakt mg	294,40	Lut-7-O-glr	3,20	1,40	0,48	0,14	Rutin	2,18	0,95	0,32	0,09	
DEV	3,4 : 1	3,4 DCCA	3,58	1,57	0,53	0,15	Lut-7-O-glc	2,08	0,91	0,31	0,08	
CF mg	187,34	3,5 DCCA	30,31	13,28	4,51	1,31	Api-7-O-glc	3,15	1,38	0,47	0,12	
SF mg	43,8	4,5 DCCA	11,97	5,24	1,78	0,52	Lut-4'-O-glc	0,55	0,24	0,08	0,02	
FF mg	43,65	Σ DCCAs	45,86	20,09	6,82	1,98	Apigenin	0,23	0,10	0,03	0,01	
							Σ Flavonoide	8,19	3,58	1,21	0,32	
D (60%)	43,90	ISTD Cynarin					38,80	ISTD Lut-3',7-di-O-glc				
Extrakt mg	289,00	Lut-7-O-glr	2,88	1,26	0,44	0,13	Rutin	2,21	0,86	0,30	0,09	
DEV	3,5 : 1	3,4 DCCA	3,25	1,43	0,49	0,14	Lut-7-O-glc	2,04	0,79	0,27	0,08	
CF mg	183,70	3,5 DCCA	25,85	11,35	3,93	1,13	Api-7-O-glc	3,04	1,18	0,41	0,12	
SF mg	43,90	4,5 DCCA	10,63	4,67	1,62	0,47	Lut-4'-O-glc	0,50	0,19	0,07	0,02	
FF mg	38,80	Σ DCCAs	39,73	17,44	6,04	1,74	Apigenin	0,23	0,09	0,03	0,01	
							Σ Flavonoide	8,02	3,11	1,08	0,32	
E (40%)	47,47	ISTD Cynarin					43,38	ISTD Lut-3',7-di-O-glc				
Extrakt mg	309,30	Lut-7-O-glr	2,88	1,37	0,44	0,14	Rutin	2,04	0,89	0,29	0,09	
DEV	3,2 : 1	3,4 DCCA	3,61	1,71	0,55	0,17	Lut-7-O-glc	1,86	0,81	0,26	0,08	
CF mg	190,27	3,5 DCCA	26,61	12,63	4,08	1,26	Api-7-O-glc	2,72	1,18	0,38	0,12	
SF mg	47,47	4,5 DCCA	10,92	5,18	1,68	0,52	Lut-4'-O-glc	0,48	0,21	0,07	0,02	
FF mg	43,38	Σ DCCAs	41,14	19,53	6,31	1,95	Apigenin	0,24	0,10	0,03	0,01	
							Σ Flavonoide	7,34	3,18	1,03	0,32	
G (20%)	45,39	ISTD Cynarin					42,33	ISTD Lut-3',7-di-O-glc				
Extrakt mg	318,90	Lut-7-O-glr	3,10	1,41	0,44	0,14	Rutin	2,08	0,88	0,28	0,09	
DEV	3,2 : 1	3,4 DCCA	4,88	2,22	0,70	0,22	Lut-7-O-glc	1,75	0,74	0,23	0,07	
CF mg	207,39	3,5 DCCA	25,16	11,42	3,58	1,12	Api-7-O-glc	2,50	1,06	0,33	0,10	
SF mg	45,39	4,5 DCCA	11,51	5,22	1,64	0,51	Lut-4'-O-glc	0,46	0,20	0,06	0,02	
FF mg	42,33	Σ DCCAs	41,55	18,86	5,92	1,85	Apigenin	0,58	0,25	0,08	0,02	
							Σ Flavonoide	7,37	3,12	0,98	0,30	
H (20%)	45,20	ISTD Cynarin					42,92	ISTD Lut-3',7-di-O-glc				
Extrakt mg	317,40	Lut-7-O-glr	2,81	1,27	0,40	0,13	Rutin	2,03	0,87	0,28	0,09	
DEV	3,2 : 1	3,4 DCCA	4,62	2,09	0,66	0,21	Lut-7-O-glc	1,60	0,69	0,21	0,07	
CF mg	202,31	3,5 DCCA	24,24	10,96	3,45	1,08	Api-7-O-glc	2,27	0,97	0,30	0,09	
SF mg	45,20	4,5 DCCA	10,62	4,80	1,51	0,47	Lut-4'-O-glc	0,48	0,21	0,06	0,02	
FF mg	42,92	Σ DCCAs	39,48	17,85	5,62	1,76	Apigenin	0,54	0,23	0,07	0,02	
							Σ Flavonoide	6,92	2,97	0,92	0,29	

Neben diesen Werten konnten aus den Voruntersuchungen auch Erkenntnisse betreffend eventuell auftretende Schwierigkeiten bei der Durchführung der Extraktzubereitung gewonnen werden.

So hatten wir bei der Verwendung von 80%igem Methanol als Extraktionsmittel in beiden Parallelansätzen ein Durchbrechen des Systems der Festphasenextraktion beobachtet. Dieses war gekennzeichnet durch eine verminderte Auftrennung der Extraktlösung und dem daraus resultierenden Auftreten von zwei Dicafeoylchinasäuren neben der „Säure-“ auch in der „Flavonoid-Fraktion“.

Bereits im Dünnschichtchromatogramm (Abbildung 10) der einzelnen Fraktionen waren die zwei blau fluoreszierenden Zonen deutlich erkennbar gewesen, und auch im HPLC-Chromatogramm der „Flavonoid-Fraktion“ schienen zwei zusätzliche Peaks auf (Abbildung 11/D, Seite 35).

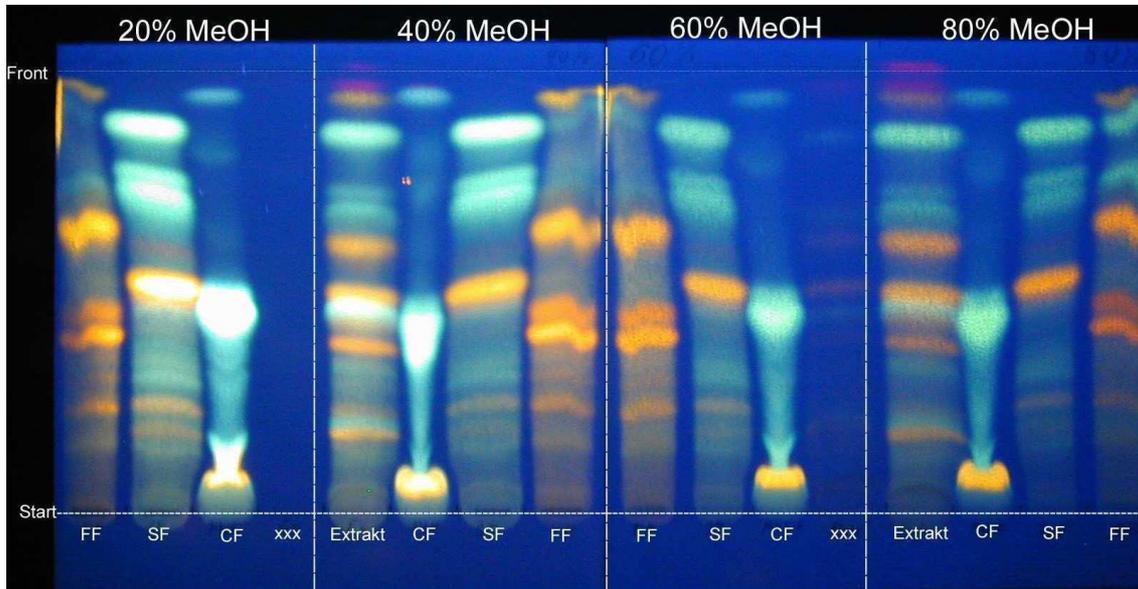


Abb. 10: Dünnschichtchromatogramme der einzelnen Fraktionen für die Extrakte aus unterschiedlichen Methanolgemischen: **FF:** „Flavonoid-Fraktion“, **SF:** „Säure-Fraktion“, **CF:** „Chlorogensäure-Fraktion“, **xxx:** Bahn leer

Zur Absicherung dieser Annahme wurde ein HPLC-Testlauf mit der „Säure-Fraktion“ im Gradientensystem der Flavonoide unternommen (Abbildung 11/B). Die Bestätigung erfolgte anhand der übereinstimmenden Retentionszeiten der Peaks für die DCCAs durch Überlagerung dieses Chromatogramms mit einem der bisher für die „Flavonoid-Fraktion“ aufgezeichneten (Abbildung 11/A – C).

Als Konsequenz daraus wurde das Gemisch von 80% aus der engeren Wahl für das geeignete Extraktionsmittel genommen. Eine quantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe innerhalb der einzelnen Fraktionen des entsprechenden Extraktes wurde jedoch durchgeführt.

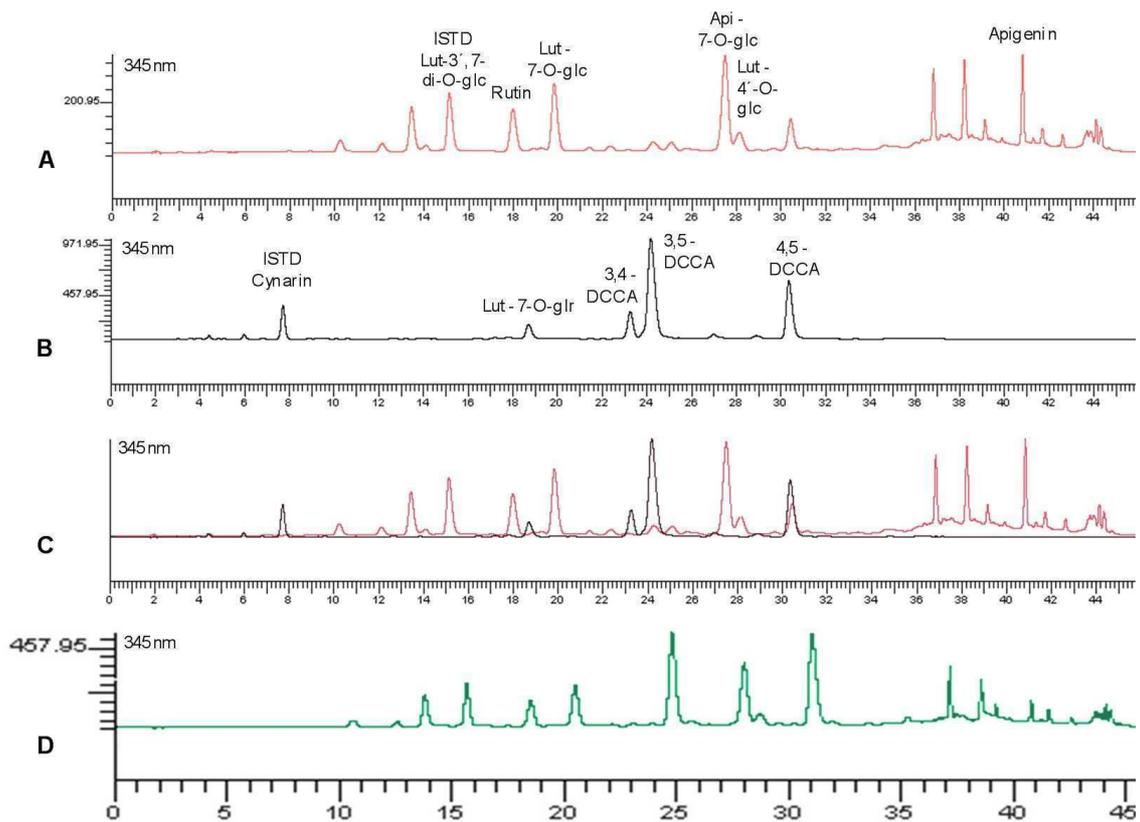


Abb. 11: Chromatogramme verschiedener Proben im Gradientensystem der „Flavonoid-Fraktion“ : **A:** „Flavonoid-Fraktion“ (20% MeOH), **B:** „Säure-Fraktion“ (20%MeOH), **C:** Überlagerung der Chromatogramme A und B , **D:** „Flavonoid-Fraktion“ des Extraktes aus 80%igem Methanol mit den beiden Peaks der DCCAs (Retentionszeiten: 3,5-DCCA: ~25 min; 4,5-DCCA: ~31min)

Nach Vermessung und Quantifizierung zeigte der Vergleich der Ergebnisse in Tabelle 10 einerseits Unterschiede in den Relationen der einzelnen Fraktionen zu den gewonnenen Extrakten, andererseits auch Variationen in der mengenmäßigen Verteilung der Substanzen innerhalb der Fraktionen.

Die Mittelwerte der für die unterschiedlichen Extraktionsmittel errechneten Gehalte an DCCAs und Flavonoiden fasst die Abbildung 12 auf der folgenden Seite zusammen. Die Verbindung der Messpunkte zu Linien soll einen Anstieg oder Abfall der Werte etwas besser veranschaulichen.

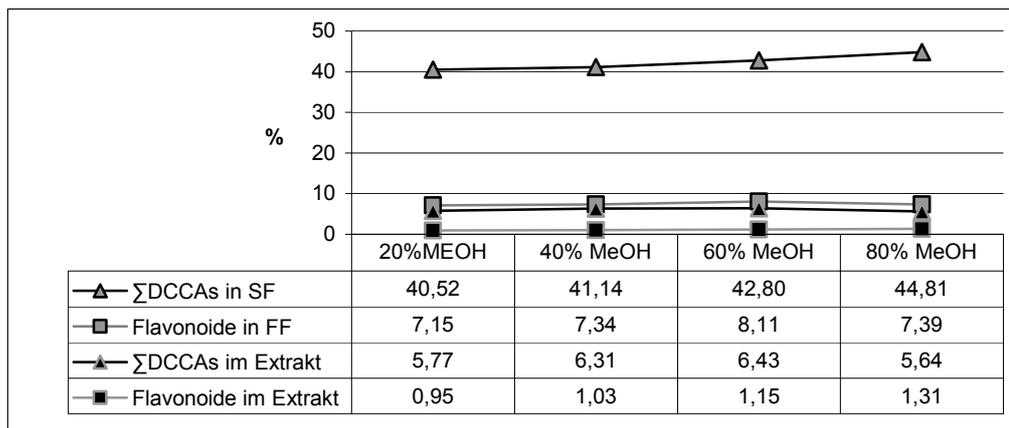


Abb. 12: Durchschnittlicher Gehalt an DicaFFEoylChinasäuren und Flavonoiden in Prozent in Abhängigkeit des verwendeten Extraktionsmittels innerhalb der jeweiligen Fraktion beziehungsweise in Relation zum Extrakt (n=2)

Bezogen auf die Extraktauswaage machte die Summe an DCCAs bei 40% MeOH 6,31%, bei 60% MeOH 6,43% aus. Für den Extrakt aus 20%igem MeOH betrug der durchschnittliche DCCA-Gehalt nur 5,77%.

Die Ergebnisse der Extraktion mit 80%igem Methanol waren aufgrund der bereits früher erwähnten schlechten Auftrennung mittels Festphasenextraktion für die DCCAs nur bedingt aussagekräftig. Die in der „Säure-Fraktion“ angereicherten DCCAs machten nur 5,64% aus, und aufgrund mangelnder Korrekturfaktoren gegenüber dem dort verwendeten internen Standard erfolgte keine separate Quantifizierung der in diesem Fall auch in der „Flavonoid-Fraktion“ auftretenden Säuren.

Die Summe der Flavonoide Rutin, Luteolin-7-O-glucosid, Apigenin-7-O-glucosid, Luteolin-4'-O-glucosid und Apigenin machte, mit zunehmendem Methanolgehalt im Extraktionsmittel ansteigend, durchschnittlich zwischen 0,95% und 1,31% des Extraktes aus und lag somit deutlich unter der der DCCAs.

Durch Hinzuzählen des Luteolin-7-O-glucuronids (0,40 – 0,54% des Extraktes) aus der „Säure-Fraktion“ ergaben sich für die 4 Methanolkonzentration in ansteigender Reihenfolge mittlere Gesamtgehalte von 1,37%, 1,47%, 1,61% und 1,80%.

Eine Gegenüberstellung der im jeweiligen Extrakt quantifizierten Inhaltsstoffe in Prozent zeigt die folgende Abbildung 13:

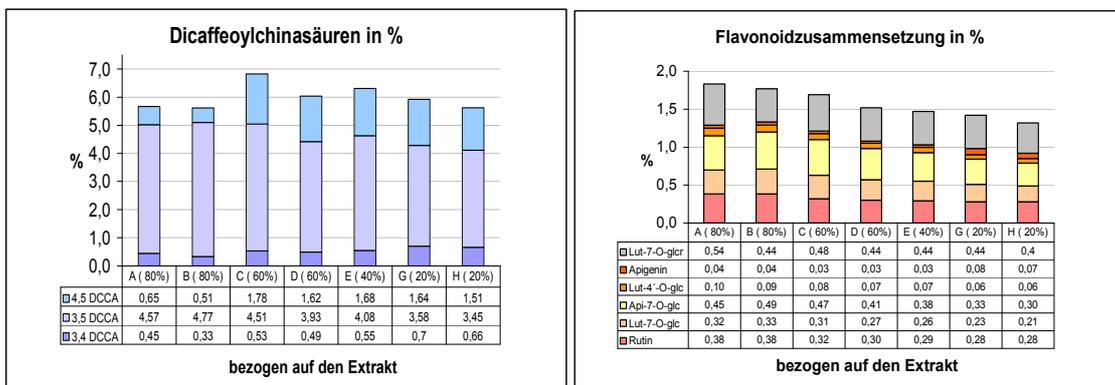


Abb. 13: Balkendiagramme der in den Vorversuchen ermittelten Werte für die Dicafeoylchinasäuren und Flavonoide bezogen auf die Extraktauswaage

Bei den Dicafeoylchinasäuren fiel auf, dass durch zunehmende Polarität des Extraktionsmittels der Gehalt an 3,4-DCCA anstieg, der des 3,5-Isomers hingegen abnahm.

Für die Flavonoide galt im Allgemeinen: je polarer das Extraktionsmittel, desto geringer war ihr Anteil im Extrakt. Lediglich für das Apigenin ergaben sich bei 20%igem Methanol deutlich höhere Werte als jene bei den weniger polaren Gemischen.

Trotz sorgfältigen Arbeitens traten bei diesen Vorversuchen Schwankungen der Werte auf, die deutlich machten, dass eine Versuchsreihe mit $n = 2$ zu geringer Aussagekraft bezüglich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit dieser Analysenmethode aufweisen würde.

Der Validierung der geeigneten Methode hatte unser besonderes Interesse zu gelten, da in weiterer Folge eine größere Anzahl zur Verfügung stehende Probenmuster verschiedene *Achillea*-Arten in der Zusammensetzung ihrer phenolischen Inhaltsstoffe vergleichend untersucht werden sollten (Benedek, 2007).

In diesem Sinne war für die als geeignetes Extraktionsmittel in die engere Wahl aufgenommenen Gemische eine Wiederholung der Versuche erforderlich.

Neben der Beschränkung auf nur mehr zwei Methanol-Konzentrationen sollten durch die Erweiterung auf sechs Versuche je Gemisch, sowie doppelte HPLC-Bestimmungen für jede Fraktion die Ungenauigkeiten, die bei den vorangegangenen Untersuchungen aufgetreten waren, möglichst verringert werden.

1.3.3.2 Auswahl des geeigneten Extraktionsmittels

Als vielversprechend bezüglich der eruierten Mengen an Inhaltsstoffen erwiesen sich die Lösungsmittelgemische mit 40% beziehungsweise 60% Methanol. Auch war das Verhältnis der Fraktionsrückstände zueinander hier ausgewogener als bei 20% oder 80%.

Sie lieferten sowohl für die polaren Phenolcarbonsäuren als auch für die lipophileren Flavonoide ausreichende Ausbeuten, welche jene der beiden anderen Methanolkonzentrationen mitunter übertrafen, und stellten somit mehr als nur einen guten Kompromiss dar.

Außerdem war die im vorigen Kapitel erwähnte Problematik der ungenügenden Auftrennung während der SPE hier nicht beobachtet worden, weshalb für die weiterführenden Tests nur mehr diese beiden Konzentrationen als Extraktionsmittel geprüft wurden.

1.3.3.2.1 Ergebnisse und Auswertung

Für jedes Gemisch war die Ausdehnung auf sechs Parallelansätze, sowie für die Quantifizierung der Inhaltsstoffe in der „Chlorogensäure-“, „Säure-“ und „Flavonoid-Fraktion“ eine Doppelbestimmung mittels HPLC erfolgt.

Die folgende Tabelle 11 fasst die ausgearbeiteten Ergebnisse für die hydromethanolischen Auszüge zusammen und bietet dem nächsten Kapitel vorgreifend gleichzeitig den Vergleich mit dem wässrigen Extrakt einer Teezubereitung, (vgl. auch Kapitel 1.3.4.1, Seite 43, Abbildung 17).

Tab. 11: Gegenüberstellung der nach Extraktion mit 40%igem und 60%igem Methanol und HPLC-Quantifizierung erhaltenen Mengen an Inhaltsstoffen aus *Millefolii herba* bezogen auf die entsprechende Fraktion, die Extraktwaage oder die Gesamtdroge. Die Durchschnittswerte resultieren aus sechs Parallelversuchen (n=6) bei Doppelvermessung (n=12)

DEV (Mittelwert)	40% MeOH			60% MeOH			Teezubereitung		
	3,4 : 1			3,8 : 1			5,0 : 1		
	40 µ (n=12)	40 asd	40 rsd	60 µ (n=12)	60 asd	60 rsd	T µ (n=4)	T asd	T rsd
% Chlorogensäure Probe	0,65	0,01	2,23	0,68	0,02	3,11	0,27	0,01	4,47
% Chlorogensäure Extrakt	2,22	0,05	2,21	2,39	0,07	2,83	1,36	0,07	5,21
% Chlorogensäure CF	3,35	0,07	2,16	3,52	0,14	3,96	1,84	0,08	4,54
Mittelwert	40 µ (n=6)			60 µ (n=6)			T µ (n=2)		
% Chlorogensäure Probe	0,65	0,02	2,30	0,68	0,02	3,22	0,27	0,01	5,41
DCCAs	40 µ (n=12)	40 asd	40 rsd	60 µ (n=12)	60 asd	60 rsd	T µ (n=4)	T asd	T rsd
% Lut-7-O-glc _r Probe	0,10	0,00	4,20	0,10	0,01	5,54	0,04	0,00	3,66
% 3,4-DCCA Probe	0,14	0,01	8,29	0,12	0,01	7,14	0,12	0,01	9,11
% 3,5-DCCA Probe	1,03	0,04	4,30	1,10	0,05	4,83	0,09	0,01	16,25
% 4,5-DCCA Probe	0,45	0,02	4,35	0,32	0,02	6,57	0,11	0,02	14,72
% DCCAs gesamt	1,63	0,06	3,69	1,54	0,08	5,11	0,33	0,04	12,96
mg EW Extrakt aliquot	40 µ (n=12)			60 µ (n=12)			T µ (n=4)		
% Lut-7-O-glc _r Extrakt	0,36	0,01	4,19	0,36	0,02	5,14	0,24	0,01	4,27
% 3,4-DCCA Extrakt	0,49	0,04	8,88	0,42	0,03	6,85	0,63	0,06	9,84
% 3,5-DCCA Extrakt	3,51	0,13	3,67	3,85	0,17	4,51	0,46	0,08	16,99
% 4,5-DCCA Extrakt	1,53	0,07	4,53	1,13	0,07	6,12	0,55	0,08	15,45
% DCCAs Extrakt	5,53	0,19	3,40	5,40	0,26	4,75	1,88	0,23	12,42
mg EW SF aliquot	40 µ (n=12)			60 µ (n=12)			T µ (n=4)		
% Lut-7-O-glc _r SF	2,47	0,12	5,04	2,59	0,11	4,11	3,17	0,08	2,39
% 3,4-DCCA SF	3,39	0,28	8,21	3,03	0,19	6,26	9,30	0,64	6,88
% 3,5-DCCA SF	24,37	1,29	5,28	27,88	0,96	3,43	6,83	0,96	13,98
% 4,5-DCCA SF	10,59	0,55	5,22	8,17	0,35	4,26	8,10	1,01	12,50
% DCCAs SF	38,36	1,79	4,68	39,08	1,34	3,42	27,40	2,62	9,57
Mittelwert	40 µ (n=6)			60 µ (n=6)			T µ (n=2)		
% Lut-7-O-glc _r Probe	0,10	0,00	3,42	0,10	0,00	4,45	0,04	0,00	3,39
% 3,4-DCCA Probe	0,14	0,01	8,25	0,12	0,01	6,80	0,12	0,01	10,81
% 3,5-DCCA Probe	1,03	0,04	3,69	1,10	0,05	4,38	0,09	0,02	19,82
% 4,5-DCCA Probe	0,45	0,02	4,09	0,32	0,02	6,64	0,11	0,02	17,57
% DCCAs gesamt	1,63	0,05	3,16	1,54	0,07	4,82	0,33	0,05	15,61
FLAVONOIDE	40 µ (n=12)	40 asd	40 rsd	60 µ (n=12)	60 asd	60 rsd	T µ (n=4)	T asd	T rsd
% Lut-7-O-glc _r Probe	0,10	0,00	4,20	0,10	0,01	5,54	0,04	0,00	3,66
% Rutin Probe	0,09	0,00	5,11	0,09	0,00	3,16	0,01	0,00	4,19
% Lut-7-O-glc _r Probe	0,08	0,00	5,85	0,08	0,01	6,86	0,02	0,00	2,53
% Api-7-O-glc _r Probe	0,14	0,01	5,22	0,14	0,01	5,33	0,05	0,00	3,48
% Lut-4'-O-glc _r Probe	0,03	0,00	15,13	0,03	0,00	11,88	0,00	0,00	22,36
% Apigenin Probe	0,01	0,00	11,96	0,01	0,00	7,67	0	0	0
% Flavonoide gesamt	0,46	0,02	3,43	0,44	0,02	4,03	0,12	0,00	1,21
mg EW Extrakt aliquot	40 µ (n=12)			60 µ (n=12)			T µ (n=4)		
% Lut-7-O-glc _r Extrakt	0,36	0,01	4,19	0,36	0,02	5,14	0,24	0,01	4,27
% Rutin Extrakt	0,30	0,01	4,69	0,31	0,01	3,17	0,15	0,01	4,86
% Lut-7-O-glc _r Extrakt	0,28	0,02	5,50	0,28	0,02	6,82	0,21	0,01	2,66
% Api-7-O-glc _r Extrakt	0,47	0,02	4,89	0,48	0,02	5,20	0,58	0,02	2,99
% Lut-4'-O-glc _r Extrakt	0,09	0,01	15,52	0,09	0,01	11,53	0,04	0,01	22,05
% Apigenin Extrakt	0,05	0,01	11,79	0,03	0,00	7,76	0	0	0
% Flavonoide Extrakt	1,55	0,05	3,13	1,55	0,06	3,79	1,22	0,01	1,17
mg EW FF aliquot	40 µ (n=12)			60 µ (n=12)			T µ (n=4)		
% Rutin FF	2,18	0,08	3,70	1,96	0,07	3,65	0,89	0,02	2,46
% Lut-7-O-glc _r FF	2,02	0,09	4,68	1,80	0,11	5,99	1,24	0,04	3,38
% Api-7-O-glc _r FF	3,38	0,14	4,08	3,03	0,15	5,03	3,43	0,18	5,39
% Lut-4'-O-glc _r FF	0,67	0,11	16,17	0,58	0,07	11,49	0,26	0,06	23,47
% Apigenin FF	0,34	0,04	11,33	0,21	0,02	7,63	0	0	0
% Flavonoide FF	9,74	0,34	3,50	8,45	0,28	3,35	6,40	0,28	4,31
Mittelwert	40 µ (n=6)			60 µ (n=6)			T µ (n=2)		
% Lut-7-O-glc _r Probe	0,10	0,00	3,42	0,10	0,00	4,45	0,04	0,00	3,39
% Rutin Probe	0,09	0,00	5,26	0,09	0,00	2,57	0,01	0,00	4,49
% Lut-7-O-glc _r Probe	0,08	0,00	5,42	0,08	0,00	5,79	0,02	0,00	0,13
% Api-7-O-glc _r Probe	0,14	0,01	5,00	0,14	0,01	4,04	0,05	0,00	3,10
% Lut-4'-O-glc _r Probe	0,03	0,00	12,67	0,03	0,00	8,35	0,00	0,00	15,50
% Apigenin Probe	0,01	0,00	6,58	0,01	0,00	2,95	0	0	0
% Flavonoide gesamt	0,46	0,02	3,41	0,44	0,02	3,51	0,12	0,00	0,04

Durch die Erhebung der Mittelwerte der in Tabelle 11 angegebenen Resultate konnte in Form der folgenden Abbildung 14 zusammengefasst werden:

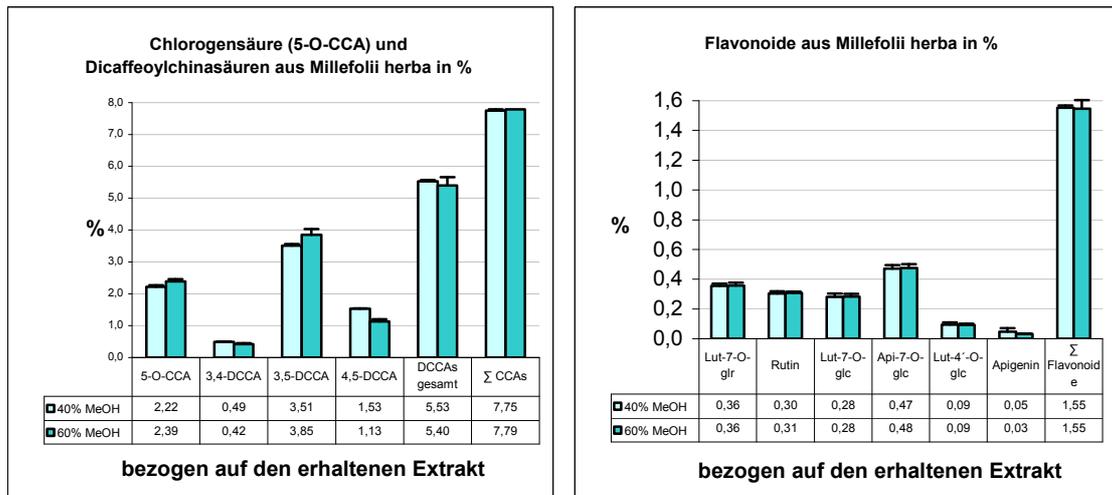


Abb. 14: Bei der Extraktion mit 40%igem und 60%igem Methanol ermittelte Durchschnittswerte für die einzelnen Inhaltsstoffe bezogen auf die Extraktauswaage angegeben in Prozent (n=6)

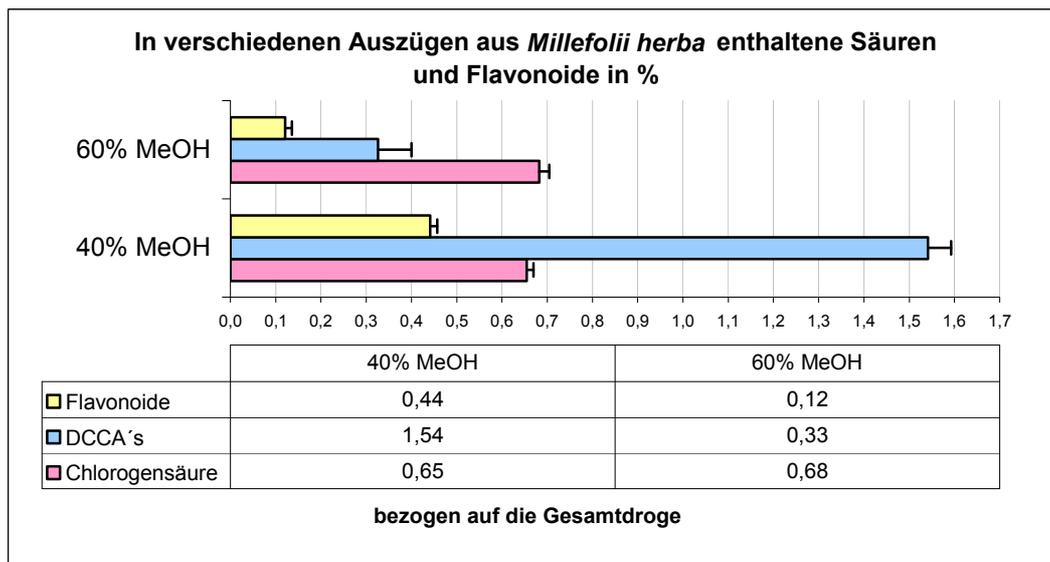


Abb. 15: Durchschnittswerte für die bei der Extraktion mit 40%igem und 60%igem Methanol erhaltenen Mengen an Chlorogensäure, Dicafeoylchinasäuren und Flavonoiden (n=6)

Mit den Ergebnissen für die Stoffgruppen zeigt die Abbildung 15, dass für die Erfassung der Dicafeoylchinasäuren und der Flavonoide bei der Extraktion des Drogenmaterials dem Gemisch aus 40 Volumsteilen Methanol und 60 Teilen Wasser der Vorzug zu geben war

1.3.4 Quantifizierung der Inhaltsstoffe aus einer Teezubereitung

Die Anwendung von *Millefolii herba* ist in der Volksmedizin und durch Überlieferungen seit langem weit verbreitet und erfolgt – meist in Mischungen – einerseits als Extrakt, aber vielfach auch als Tee.

Durch die Quantifizierung der Caffeoylechinasäure-Derivate und der Hauptflavonoide aus einer Teezubereitung sollte in zwei Parallelversuchen auch ein Richtwert für die auf diese Weise applizierbaren Mengen ermittelt werden.

Die Zubereitung des Tees erfolgte wie in Kapitel 1.1.2.1 (Seite 8 f) beschrieben, einem Vorschlag aus der Literatur entsprechend, wobei – verglichen mit den hydromethanolischen Auszügen – von der doppelten Drogeneinwaage ausgegangen wurde.

Der wässrige Extrakt wurde im Anschluss lyophilisiert. Nach der Ermittlung des DEV erfolgte auch hier die Fraktionierung mittels Festphasenextraktion (siehe Kapitel 1.1.2.2, Seite 9).

Das danach angefertigte Dünnschichtchromatogramm zeigt die folgende Abbildung 16 wobei im Vergleich mit den früher besprochenen hydromethanolischen Auszügen auffiel, dass das in der „Flavonoid-Fraktion“ knapp unter der Front erwartete Apigenin in der Teezubereitung fehlte. (Vergleiche Kapitel 1.3.1, Abbildung 4 auf Seite 25)

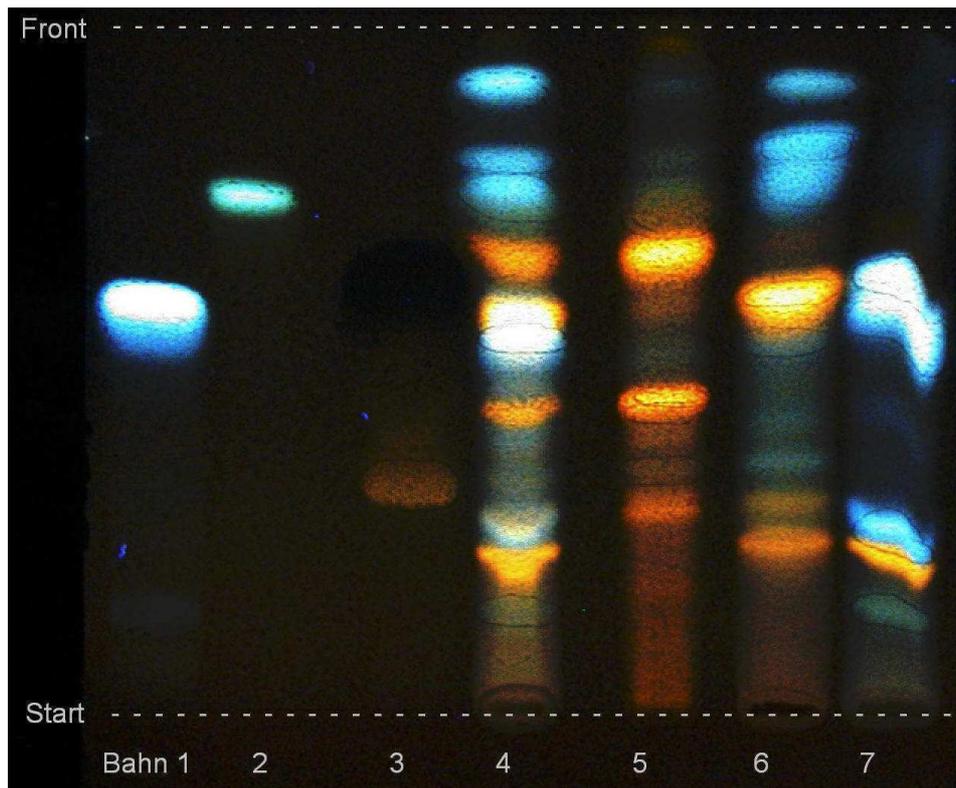


Abb. 16: Dünnschichtchromatogramm einer Teezubereitung, ihrer einzelnen Fraktionen sowie der verwendeten Standards: **Bahn 1:** Chlorogensäure, **2:** Cynarin, **3:** Luteolin- 3',7-di-O-glucosid, **4:**Extrakt, **5:** Flavonoid-Fraktion (FF), **6:** Säure-Fraktion (SF), **7:** Chlorogensäure-Fraktion (CF) (Zuordnung der Zonen siehe **Abb. 4**, Seite 25)

Die Auswaagen der nach Festphasenextraktion erhaltenen, einzelnen Fraktionsrückstände gaben Anlass zu einer Abänderung der Aliquotierung für die HPLC-Quantifizierung der Teezubereitung.

So wurde die „Chlorogensäure-Fraktion“ (~ 293,7 mg) in 5,00 ml 20% MeOH gelöst, 100 µl davon auf 1,00 ml verdünnt und nach dem Zentrifugieren gegen die Reinsubstanz als externem Standard bei 345 nm mittels der in Kapitel 1.1.4.2.2 auf Seite 17 beschriebenen HPLC- Methode je zweimal vermessen.

Die „Säure-Fraktion“ (~ 57 mg) wurde ebenfalls in 5,00 ml 20% MeOH gelöst, 500 µl davon mit 200 µl der Cynarin- Standardstammlösung versetzt, auf 1,00 ml verdünnt, zentrifugiert und mit der in Kapitel 1.1.4.2.3 auf Seite 18 beschriebenen HPLC-Methode in Doppelbestimmung vermessen.

Den geringsten Anteil des Extraktes machte die Flavonoid-Fraktion (~ 27 mg) aus. Dieser Rückstand wurde in lediglich 2,00 ml 80% MeOH gelöst. 500 µl

davon, mit 200 µl der Luteolin-3',7-di-O-glucosid Standardstammlösung versetzt und auf 1,00 ml verdünnt, wurden ebenfalls zentrifugiert und mit der in Kapitel 1.1.4.2.4 auf Seite 18 beschriebenen HPLC-Methode in Doppelbestimmung vermessen.

1.3.4.1 Ergebnisse

Eine Zusammenfassung der erhaltenen Daten für die Teezubereitung sowie die methanolischen Extrakte stellt Tabelle 11 auf Seite 39 dar (Kapitel 1.3.3.2.1).

Erwartungsgemäß war die Extraktausbeute bei den wässrigen Auszügen deutlich niedriger, das Droge-Extrakt-Verhältnis betrug hier 5 : 1.

Setzte man die Trockengewichte der Fraktionen mit der Extraktwaage in Relation, so machte auch hier die „Chlorogensäure-Fraktion“ mit durchschnittlich 73,75% den Hauptanteil aus.

Mit 14,25% lag der Anteil der „Säure-Fraktion“ nur knapp unter den für die hydromethanolischen Auszüge ermittelten Werten, der der „Flavonoid-Fraktion“ hingegen mit nur noch 6,75% etwa auf die Hälfte reduziert.

Die in der Teezubereitung gemessenen Mengen und Zusammensetzungen der Caffeoylchinasäure-Derivate und der Flavonoide beschreibt Abbildung 17:

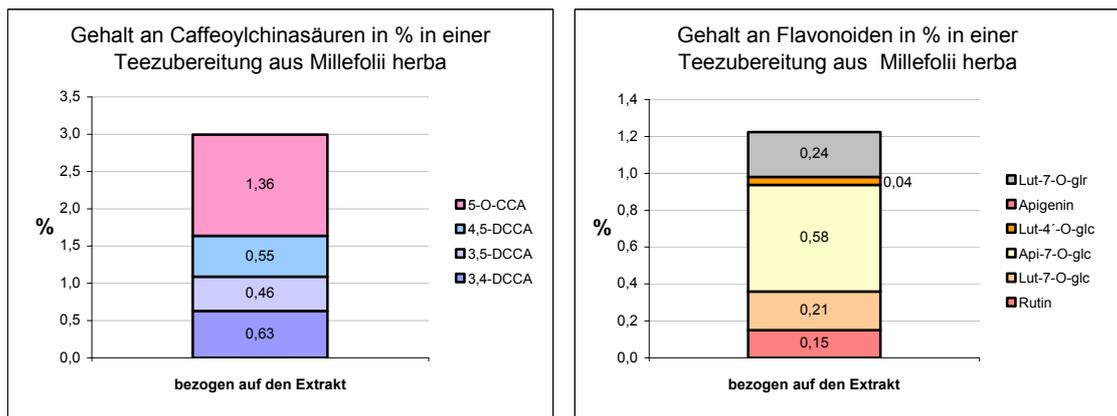


Abb. 17: Gehalt an Chlorogensäure, Dicafeoylchinasäuren und Flavonoiden in einer Teezubereitung nach Aufbereitung mittels SPE bezogen auf die Extraktwaage (n=2)

Der im wässrigen Extrakt meist vertretene Inhaltsstoff war die Chlorogensäure mit einem durchschnittlichen Anteil von 1,36%.

Für die DicaFFEoylchinasäuren konnte ein Gesamtgehalt von 1,88% ermittelt werden. Auffällig war hier jedoch das ausgesprochen ausgewogene Verhältnis der drei Strukturisomere zueinander. Im Gegensatz zu den methanolischen Auszügen, wo die 3,5-DCCA jeweils den Hauptanteil (und das 2-3fache der 4,5-DCCA, sowie das 7-9fache der 3,4-DCCA) ausmachte, stellte sie hier mit nur 0,46% die kleinste Komponente der Säuren dar.

Das ebenfalls aus der „Säure-Fraktion“ stammende polare Luteolin-7'-O-glucuronid war durchschnittlich mit 0,24% im wässrigen Extrakt vertreten.

Addiert man es zu den in der „Flavonoid-Fraktion“ enthaltenen Flavonoiden Apigenin-7-O-glucosid, Luteolin-7-O-glucosid, Rutin und Luteolin-4'-O-glucosid, so macht deren Gehalt in Summe 1,22% aus.

Das Aglykon Apigenin war in der Teezubereitung nur noch in äußerst geringen Mengen enthalten, wie schon das Fehlen der entsprechenden Zone im Dünnschichtchromatogramm gezeigt hatte, sodass dessen Quantifizierung hier entfiel.

Einen Überblick über die verschiedenen mit 40% MeOH, 60% MeOH und Wasser erhaltenen Werte soll die folgende Abbildung 18 bieten.

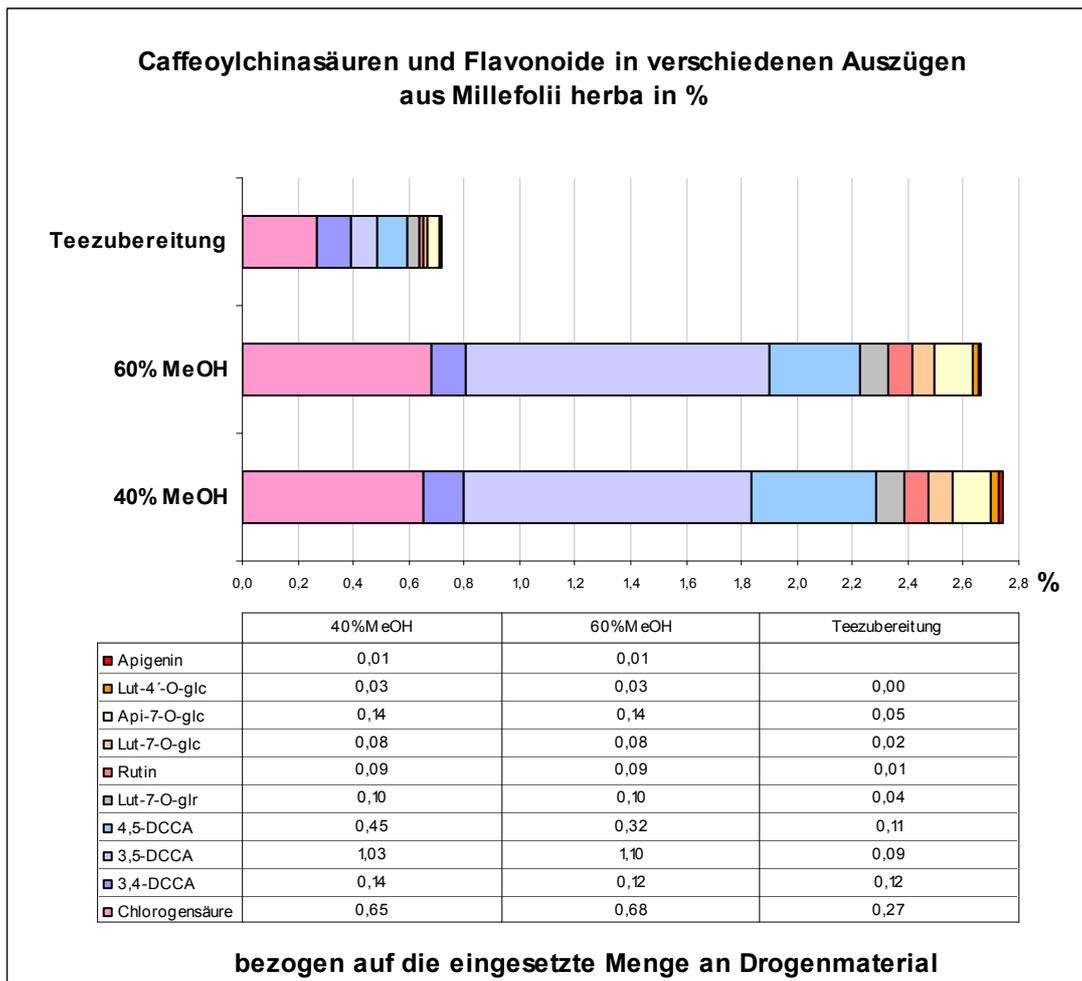


Abb. 18: Auswirkungen des Extraktionsmittels auf Gehalt und Verteilung an Inhaltsstoffen durch Gegenüberstellung von Auszügen aus Wasser, 40%igem und 60%igem Methanol (V/V)

1.3.5 Quantifizierung der für die pharmakologische Testung herangezogenen „Säurefraktion IPRL“

Um die später beschriebenen Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber (siehe Kapitel 1.4.2.2) besser beurteilen zu können, wurde weiters die Quantifizierung der Inhaltsstoffe der dort untersuchten Fraktion aus *Millefolii herba* beschlossen.

Diese stellte eine durch Festphasenextraktion eines Extraktes (20% V/V MeOH) gewonnene Anreicherung der strukturisomeren DicaFFEoylchinasäuren 3,4-, 3,5- und 4,5-DCCA gemeinsam mit dem Luteolin-7-O-glucuronid dar und war eigens im Vorfeld dieser Arbeit, wie in Kapitel 1.1.3 ab Seite 11 beschrieben, hergestellt worden.

1.3.5.1 Ergebnisse

Für die HPLC-Analytik wurden 4,16 mg der Fraktion mit 200 µl der Cynarin-Stammlösung als internem Standard versetzt, mit 20% Methanol auf 1,00 ml verdünnt, 10 Minuten lang bei 13500 U/min zentrifugiert und der Überstand mit der in Kapitel 1.1.4.2.3 auf Seite 18 genannten Methode in Doppelbestimmung vermessen.

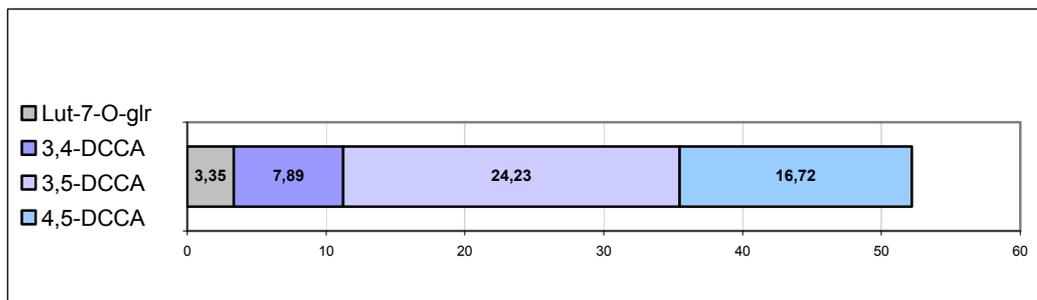


Abb. 19: Prozentuelle Verteilung der phenolischen Inhaltsstoffe in Säurefraktion IPRL

Der Gesamtanteil der DicaFFEoylchinasäuren am Fraktionsrückstand lag bei durchschnittlich 48,84%.

Nahezu die Hälfte davon machte die 3,5-DCCA aus, etwa ein Drittel die 4,5-DCCA. Der Anteil der 3,4-DCCA hingegen lag nur bei circa einem Sechstel. Die Quantifizierung des Luteolin-7-O-glucuronid ergab 3,35% der Fraktionsauswaage.

1.4 Pharmakologische Testung

1.4.1 Allgemeines

Die Verwendung von Schafgarbenkraut bei dyspeptischen Beschwerden, sowie als Leber- und Galletherapeutikum ist weit verbreitet, jedoch waren bisher keine pharmakologische Untersuchungen unternommen worden, die Beweise für die Wirksamkeit erbracht und diese in der Volksmedizin überlieferten Anwendungsgebiete bestätigt hätten.

Ausgehend von den vorliegenden Belegen über die choloretische Effekte der DicaFFEoylchinasäuren (mit Cynarin als wirksamkeitsbestimmendem Hauptvertreter) aus Zubereitungen der Artischocke (*Cynara scolymus* L.) am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber (IPRL) bestand Interesse an ähnlichen Untersuchungen mit einer *Achillea*-Fraktion und der im Handel erhältlichen Reinsubstanz Cynarin als Positivkontrolle (Matuschowski, 1998).

Die daraufhin in Zusammenarbeit mit dem *Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie der Medizinischen Universität Wien* unternommenen Testungen an der IPRL waren die ersten dieser Art für die Schafgarbe.

Weiterführende Untersuchungen betreffend die Cholerese würden die Überprüfung der Gallensäureausscheidung und Zusammensetzung der Galle oder Metabolitenbestimmungen beinhalten und können durch fraktionierendes Sammeln, sowie durch Präparation und Elution der Leber im Anschluss an die Perfusion vorgenommen werden. Ebenso bestünde dadurch die Möglichkeit, die Speicherkapazität der Leber für die jeweilige Prüfsubstanz zu ermitteln.

Variationsmöglichkeiten bestehen beispielsweise auch in der Abänderung des Puffersystems oder des Perfusionsaufbaus (Ring, 2000).

1.4.2 Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber

Dank der im Kapitel 1.1.2.2 beschriebenen Methode der Festphasenextraktion war es möglich geworden, die aus *Millefolii herba* gewonnenen Extrakte entsprechend der Inhaltsstoffe aufzutrennen, um die DicaFFEoylChinasäuren in der „Säure-Fraktion“ anzureichern.

Ziel des hier beschriebenen pharmakologischen Teiles der Arbeit war es, in vergleichenden Tests zu untersuchen, ob die in der Schafgarbe enthaltenen drei Strukturisomere 3,4-DCCA, 3,5-DCCA und 4,5-DCCA ähnlich choloretische Wirkung aufweisen, wie für die 1,3-DCCA Cynarin bereits belegt wurde. Außerdem bestand die Absicht, sowohl für die Reinsubstanz als auch für die angereicherte Fraktion anhand von drei Konzentrationen die Relation zwischen Dosis und Wirkung zu beobachten.

Dies sollte, nicht zuletzt um die Anzahl der benötigten Versuchstiere möglichst gering zu halten, jeweils innerhalb eines Perfusionslaufs erfolgen. Darauf stellte sich bei der Planung des Ablaufes die Frage der Verweildauer beziehungsweise der Speicherung der jeweiligen Substanzen in der Leber.

Ein Einrichten von Auswaschphasen zwischen den Prüflösungen hätte zwangsläufig, unter Berücksichtigung der eingeschränkten Lebensdauer des Organs *ex vivo*, die Verkürzung der einzelnen Perfusionsabschnitte zur Folge.

Diese Überlegungen machten Vorversuche erforderlich, in denen, nach Ermittlung der geeigneten Lösungsmittel, die entsprechenden Konzentrationen und Testbedingungen festgelegt werden sollten.

1.4.2.1 Vorversuche und Wahl der Testbedingungen

Beginnend mit der als choloretisch wirksam bewiesenen Reinsubstanz Cynarin galt es zunächst, das unter physiologischen Gesichtspunkten optimale Lösungsmittel zu bestimmen.

Diesem gegenüber hat eine bestimmte Toleranz der Leber zu bestehen, in deren Rahmen keine Beeinträchtigung der Organfunktionen zu befürchten ist. Weiters muss darauf geachtet werden, dass beim Zusetzen der Prüflösung zum

Perfusionspuffermedium keinerlei Fällungen auftreten, da diese irreversible Schäden am Organ verursachen würden.

Aufgrund guter Lösungseigenschaften für Cynarin und einer Verträglichkeit bis zu einer Konzentration von maximal 2 Promille fiel die Wahl auf Ethanol.

Die Herstellung der, für sämtliche Versuche verwendeten, etwa 1%igen Stammlösung erfolgte durch Lösen von 20,2 mg der Reinsubstanz in 2,00 ml Ethanol.

Dass die Zugabe der Stammlösung zur temperierten Pufferlösung keine Fällungen verursacht, wurde überprüft und bestätigt.

Dementsprechend sollte eine ähnliche Stammlösung für die strukturisomeren DicaFFEoylchinasäuren aus der angereicherten Fraktion aus *Herba Millefolii* hergestellt werden.

Die aus einem 20%igen methanolischen Extrakt durch Festphasenextraktion gewonnene „Säurefraktion IPRL“ (3,4-, 3,5- und 4,5-DCCA, gemeinsam mit dem polaren Flavonoid Luteolin-7-O-glucuronid angereichert) stand mit nur etwa 1,3 g in verhältnismäßig geringer Menge zur Verfügung (siehe Kapitel 1.1.3 ab Seite 11).

In der Annahme, die Fraktion würde nur einen Bruchteil der Wirksamkeit der Reinsubstanz Cynarin aufweisen, wurde für deren Untersuchung zunächst die zehnfache Konzentration festgesetzt. Somit ergaben sich für die Perfusion der „Säure-Fraktion“ Konzentrationen von 10 mg und 100 mg Substanz pro Liter Perfusionspuffer.

Da die 104,5 mg Einwaage des durch Lyophilisation erhaltenen Rückstands in 1,00 ml Ethanol nicht löslich war, versuchten wir, ob sich eventuell der Perfusionspuffer selbst als Lösungsmittel eignen würde. 15,7 mg der Fraktion, die 150 ml des temperierten Krebs-Henseleit-Puffers (KHB) zugesetzt wurden, lösten sich darin innerhalb weniger Minuten vollständig, ohne Fällungen oder Trübungen zu verursachen. Für alle weiteren Versuche wurden demnach die entsprechenden Mengen des Lyophilisats direkt in den vorbereiteten Portionen des Puffermediums gelöst. Bei einer Pumpleistung von 35 ml/min wurden für

die zehnmütigen Perfusionen jeweils 500 ml Perfusionslösung je Konzentration bereitet.

Beginnend mit Cynarin wurde der erste Vorversuch („Cyn V1“) mit 1 mg/l und 10 mg/l Perfusionsmedium ohne zwischengeschaltete Auswaschphasen vorgenommen.

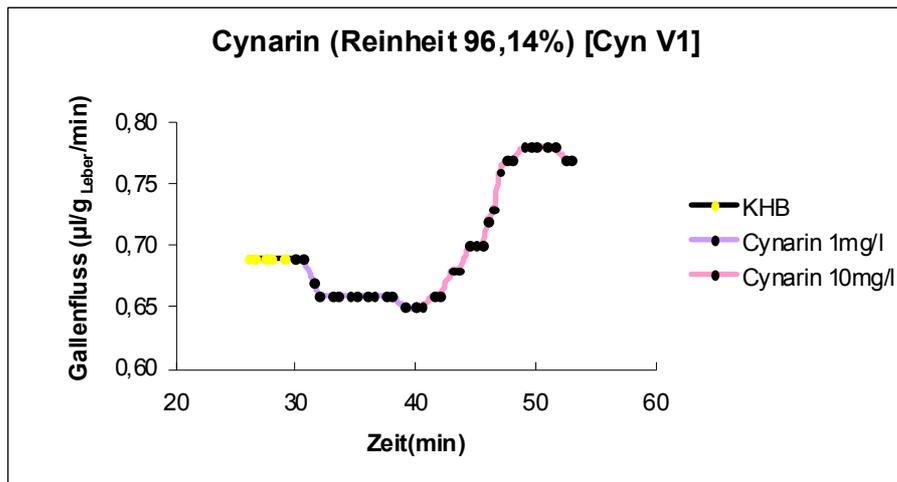


Abb. 20: Erster Vorversuch mit Perfusion der Reinsubstanz Cynarin (1,3-DCCA) mit direktem Wechsel zur nächst höheren Konzentrationsstufe

Mit einem Abfallen des Gallenflusses von durchschnittlich - 4,12% bei 1 mg/l und einem mittleren Anstieg von +10,77% gegenüber dem Ausgangswert bei 10 mg/l war für die weiteren Versuche eine Konzentrationserhöhung erforderlich (siehe Abbildung 20).

Für die zu untersuchende „Säurefraktion IPRL“ wurden geringere choleretische Effekte als für Cynarin erwartet und deshalb der Gehalt von 10 mg auf 50 mg pro Liter Puffer erhöht. Mit 100 mg und 200 mg wurden zwei weitere Konzentrationen untersucht („SF V1“, vgl. Abbildung 21, nächste Seite).

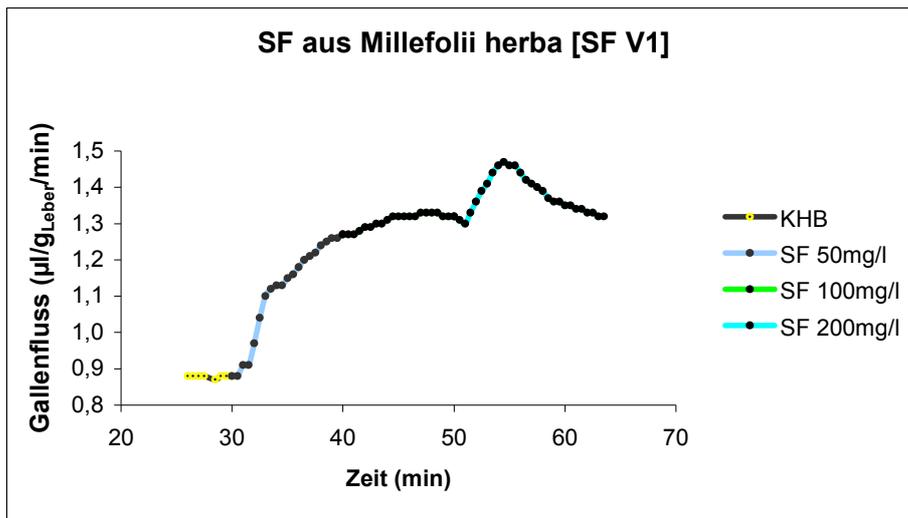


Abb. 21: Perfusion der zu prüfenden „Säurefraktion IPRL“ (eine Anreicherung von 3,4-, 3,5- und 4,5-DCCA, sowie Luteolin-7-O-glucuronid)) mit direktem Wechsel zur nächst höheren Konzentrationsstufe

Die in diesem Vorversuch erhaltenen Ergebnisse für die aus *Millefolii herba* gewonnene Fraktion lagen mit einem mittleren Anstieg von +27,00% bei 50 mg/l über den Erwartungen. Da auch hier noch ohne Auswaschphasen getestet wurde, ergaben sich für 100 mg/l weitere +3,11%, für 200 mg/l darüber hinaus +5,64% Anstieg, jeweils gegenüber dem Endwert der vorangegangenen Konzentrationsstufe.

Das bei 200 mg ermittelte Anstiegmaximum betrug sogar +11,36%, war allerdings nur kurz anhaltend. Mit dem darauf folgenden raschen Abfallen des Gallenflusses bis auf das Niveau vor Beginn dieser letzten Perfusionsstufe schien die Kapazität der Leber erreicht und ausgeschöpft worden zu sein.

Wie der Kurvenverlauf in Abbildung 21 zeigt, bewirkt jedoch schon die Verdopplung der Konzentration von 50 mg auf 100 mg/l nur einen verhältnismäßig geringen Anstieg, so dass für die weiteren Versuche eine Dosisoptimierung vorgenommen wurde. Die Reduktion auf ein Fünftel des Gehalts ergab für den letzten Vorversuch die drei Konzentrationsstufen 10 mg, 20 mg und 40 mg pro Liter Perfusionsmedium.

1.4.2.2 Ergebnisse

Nach den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Vorversuchen wurden sowohl für die „Säurefraktion IPRL“ (SF), als auch für die Vergleichssubstanz Cynarin (Cyn) jeweils drei Perfusionsläufe mit den Konzentrationen 10 mg, 20 mg und 40 mg Substanz pro Liter Pufferlösung durchgeführt. Zwischen die einzelnen Perfusionsstufen wurden zehninütige Auswaschphasen mit reinem Krebs-Henseleit-Puffer geschaltet.

Trägt man den mithilfe der registrierten Gallentropfen berechneten Gallenfluss in ein Zeitdiagramm ein und verbindet die Messpunkte miteinander, so ergibt sich für einen Perfusionslauf eine Kurve mit etwa folgendem Aussehen (siehe Abbildung 22):

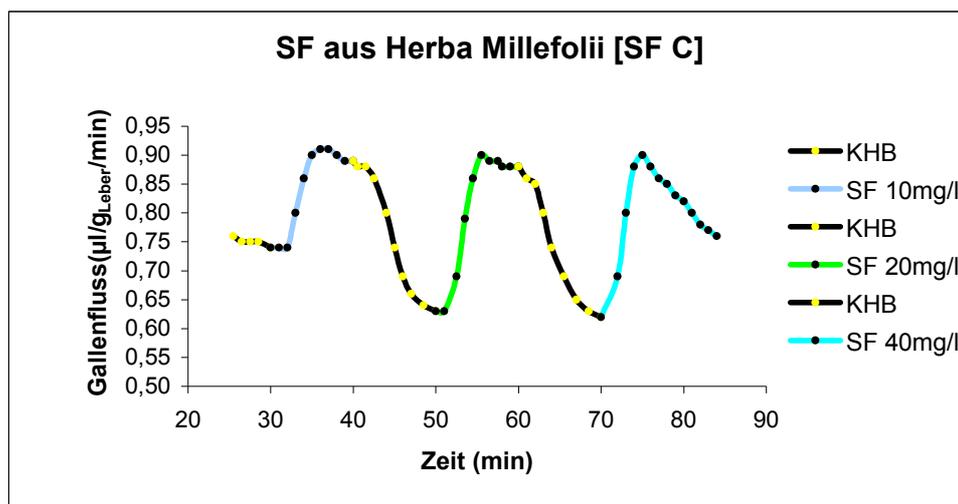


Abb. 22: Perfusion der zu prüfenden „Säurefraktion IPRL“ (eine Anreicherung von 3,4-, 3,5-, 4,5-DCCA und Luteolin-7-O-glucuronid) mit Auswaschphasen zwischen den ansteigenden Konzentrationsstufen

Die Abbildung 22 zeigt, dass sich durch die 10minütigen Auswaschphasen der Gallenfluss wieder verringerte. Der Wert zum Zeitpunkt des neuerlichen Wechsels von der reinen Pufferlösung zur Untersuchungslösung diente als Ausgangswert für die Berechnung des nächsten Anstieges.

Das auffällige, kontinuierliche Sinken der Gallenflussgrundlinie (bis unter das zu Perfusionsbeginn ermittelte Ausgangsniveau) konnte auch bei Perfusionen mit

reinem Puffer ohne Substanz beobachtet werden (Matuschowski, 1998). Als Ursache dafür wird die unter *ex vivo* Bedingungen begrenzte Lebensdauer des Organs vermutet.

Nach drei erfolgten Perfusionen ergaben sich für die Reinsubstanz Cynarin die folgenden Eckdaten:

Tab. 12: Einfluss von Cynarin auf den Gallenfluss am Modell der IPRL anhand von 10minütigen Perfusionen sich jeweils verdoppelnder Konzentrationen und 10minütigen Auswaschphasen. **Anstieg maximalwerte:** höchster Einzelwert je Prüflösung, **Anstiegsmittelwerte:** Durchschnittsanstiege nach 10 min

	1.Versuch	2.Versuch	3.Versuch			
Gewicht Ratte	210g	261g	255g			
Gewicht Leber	11,0g	13,2g	12,3g			
Galle	8 mg	8 mg	8 mg			
Pumpleistung	35 ml/min	35 ml/min	35 ml/min			
Anstieg Mittel in %				Mittelwert	STABW	rel. STABW
10 mg/l	+3,13	-0,08	+1,26	+1,44	±1,61	112,22
20 mg/l	+4,98	+7,59	+11,36	+7,98	±3,21	40,21
40 mg/l	+12,13	+6,46	+19,44	+12,68	±6,51	51,33
Anstieg Max. in %						
10 mg/l	+3,45	+4,55	+7,37	+5,12	±2,02	39,46
20 mg/l	+12,20	+16,25	+19,32	+15,92	±3,57	22,43
40 mg/l	+20,51	+13,33	+30,95	+21,60	±8,86	41,03

Bei der Untersuchung von Cynarin als bewiesen choloretisch wirksamer Positivkontrolle konnten für die erste Konzentrationsstufe (10 mg pro Liter Lösung) während der zehnminütigen Perfusionsläufe Anstiegsmaxima zwischen +3,45% und +7,37% gegenüber dem jeweiligen Ausgangsniveau beobachtet werden.

Im Mittel stieg der Gallenfluss mit 10 mg Cynarin pro Liter um +1,44% an, wobei es bei einem einzigen Versuch zu einer durchschnittlichen Abnahme um -0,08% gegenüber der Auswaschphase kam.

Die nächste Konzentration von 20 mg Cynarin je Liter Perfusat bewirkte bereits Anstiegsmaxima zwischen +12,20% und +19,32%.

Durchschnittlich wurde der Gallenfluss um +7,98% verstärkt.

Bei 40 mg Cynarin registrierten wir einen maximal zwischen +13,33% und +30,95% gesteigerten Gallenfluss.

Die zehninütige Perfusion ergab einen durchschnittlichen Zuwachs von +12,68%.

Im Anschluss an die Versuche mit Cynarin wurden jene mit den strukturverwandten DicaFFEoylchinasäuren 3,4-, 3,5- und 4,5-DCCA aus *Achillea millefolium* unternommen. Ihr Anteil an der „Säurefraktion IPRL“ (SF) macht in Summe etwa 48,84% aus, der des polaren Flavonoids Luteolin-7-O-glucuronid etwa 3,35% (vgl. Kapitel 1.3.5). Mit nur 1,3 g stand diese Anreicherung in begrenzter Menge zur Verfügung (vgl. Kapitel 1.1.3.2). Dank der einheitlich geglückten Perfusionsläufe und positiven Ergebnisse erwies sich dies jedoch für die geplante Anzahl der Versuche als ausreichend.

Nach drei erfolgten Tests konnten für die Fraktion aus *Achillea millefolium* nachstehende Anstiege des Gallenflusses beobachtet werden:

Tab. 13: Einfluss der „Säurefraktion IPRL“ aus *Millefolii herba* auf den Gallenfluss anhand von 10minütigen Perfusionen sich jeweils verdoppelnder Konzentrationen und 10minütigen Auswaschphasen. **Anstiegsmaximalwerte:** höchster Einzelwert je Prüflösung, **Anstiegsmittelwerte:** Durchschnittsanstiege nach 10 min

	Versuch 4	Versuch 5	Versuch 6			
Gewicht Ratte	215g	270g	179g			
Gewicht Leber	11,4g	15,4g	9,6g			
Galle	8 mg	8 mg	8 mg			
Pumpleistung	35 ml/min	35 ml/min	35 ml/min			
Anstieg Mittel in %				Mittelwert	STABW	rel. STABW
10 mg/l	+18,00	+10,54	+15,41	+14,65	±3,79	25,85
20 mg/l	+41,27	+19,18	+31,59	+30,68	±11,07	36,09
40 mg/l	+39,79	+27,37	+34,59	+33,92	±6,24	18,39
Anstieg Max. in %						
10 mg/l	+30,00	+16,22	+22,97	+23,06	±6,89	29,88
20 mg/l	+61,90	+27,54	+42,86	+44,10	±17,21	39,03
40 mg/l	+60,47	+36,36	+45,16	+47,33	±12,20	25,78

Bereits die niedrigste Konzentration von 10 mg Fraktion pro Liter Perfusionsmedium bewirkte Anstiegsmaxima von +16,22%, +22,97% und sogar +30,00%.

Nach den drei Versuchen wurde für den Gallenfluss nach zehnmündigen Perfusionen ein mittlerer Anstieg von +14,65% errechnet.

20 mg des untersuchten DCCA-Gemisches steigerten die Cholerease maximal um +27,54%, +42,86% sowie +61,90%. Im Mittel wurde der Gallenfluss um +30,68% erhöhet.

Die nochmalige Verdopplung der Konzentration auf 40 mg „Säurefraktion IPRL“ je Liter Perfusionsmedium verstärkte den Gallenfluss in zehn Minuten durchschnittlich um +33,92%, maximal wurden hier +36,36%, +45,16% und +60,47% Anstieg beobachtet.

Die Abbildung 23 zeigt die Mittelwerte der beobachteten Maximalanstiege der jeweiligen Prüfsubstanz nach drei Versuchen in Diagrammform.

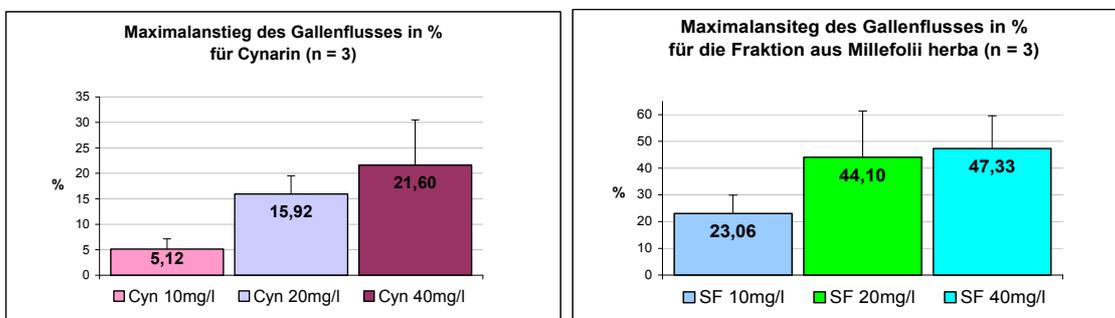


Abb. 23: Mittelwerte der Anstiegsmaxima nach drei Versuchen für die drei Konzentrationen der beiden Prüfsubstanzen Cynarin und Säurefraktion aus *Millefolii herba*

Für Cynarin ergab die Konzentrationsverdopplung von 10 mg/l (+5,12%) auf 20 mg/l in etwa eine Verdreifachung (+15,92%), für die weitere auf 40 mg/l eine Vervierfachung (+21,60%) der Anstiegsmaximalwerte.

Die DCCAs aus der Schafgarbe hingegen bewirkten bereits in der niedrigsten Konzentration von 10 mg „Säurefraktion IPRL“ pro Liter ein durchschnittliches Anstiegsmaximum von +23,06%. Mit der Erhöhung der Konzentration auf

20 mg/l konnte hier sogar nochmals eine Verdopplung des mittleren Anstiegsmaximums auf +44,10% erreicht werden.

Deutlich geringer hingegen war der Zuwachsfaktor für die Konzentration von 40 mg/l. Gegenüber der Verdopplung beim vorigen Schritt konnte hier lediglich eine weitere Steigerung von durchschnittlich +7,3% auf +47.33% beobachtet werden.

Es besteht die Vermutung, dass die Kapazität der Leber betreffend die Gallenproduktion bereits mit 20 mg „Säurefraktion“ pro Liter Perfusionsmedium nahezu erreicht und durch die Konzentrationsverdopplung bis an ihr Maximum ausgeschöpft worden ist.

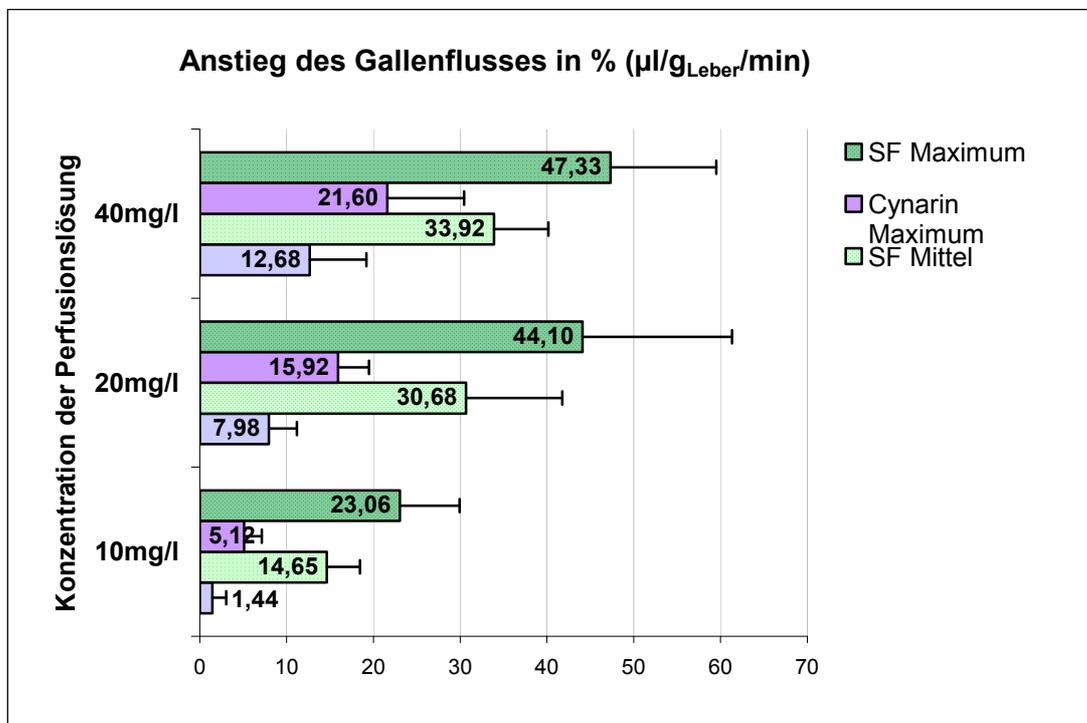


Abb. 24: Auswirkungen von Cynarin und der „Säurefraktion IPRL“ auf den Gallenfluss in Form der Mittelwerte aus jeweils drei Versuchen: Die durchschnittlichen Maximalanstiege stehen den Mittelwerten nach 10minütiger Perfusion gegenüber.

In Abbildung 24 stehen für Cynarin sowie die „Säurefraktion IPRL“ mit den strukturisomeren DCCAs die oben besprochenen Anstiegsmaximalwerte den aus zehnminütigen Perfusionsstufen errechneten Durchschnittsanstiegen gegenüber.

4. Diskussion

Anschließend an Vorgängerarbeiten widmete sich diese Diplomarbeit über phenolische Inhaltsstoffe in *Millefolii herba* neben den Flavonoiden in erster Linie den Phenolcarbonsäuren in Form der Caffeylchinasäure-Derivate.

Ziel war es, eine optimale Extraktionsmethode zu entwickeln, nach der für die zur Verfügung stehenden Probenmuster verschiedener *Achillea* – Arten eine Quantifizierung eben dieser Inhaltsstoffe möglich würde (Benedek, 2007). Für das ätherische Öl und die Sesquiterpenlactone waren entsprechende Untersuchungen bereits früher erfolgt (Glasl, 1999; Rothwangl - Wiltschnigg, 2004).

Das Hauptbestreben im phytochemischen Teil der vorliegenden Arbeit lag darin, aus vier Methanol-Wasser-Gemischen ansteigender Polarität (80%, 60%, 40% und 20% (V/V) Methanol) das günstigste zur Erfassung der Flavonoide und Caffeylchinasäure-Derivate zu eruieren.

Anhand der in früheren Arbeiten entwickelten Aufbereitungsmethode mittels Festphasenextraktion war eine Auftrennung der Inhaltsstoffe nach ihrer Polarität und entsprechende Fraktionierung gelungen. Dadurch war es möglich geworden, die DicaFFEoylchinasäuren getrennt von den Hauptflavonoiden zu quantifizieren (Nemetz, 2003, Trauner, 2004).

Ausgehend von dem in ausreichender Menge zur Verfügung stehenden Probenmuster einer Charge von *Achillea millefolium var. roseo-alba* L. sollte für die Verifizierung und Optimierung der Methode zwecks Vergleichbarkeit der Werte an dieser Stelle nur dieses Drogenmaterial verwendet werden.

In den Vorversuchen wurden zunächst alle vier Konzentrationen als Doppelansatz gegenübergestellt. Die Extraktion wurde wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben durchgeführt, und nach Trocknung der Auszüge waren bereits bei der Ermittlung des Droge-Extrakt-Verhältnisses (DEV) Unterschiede erkennbar. Die Auswaagen stiegen proportional zur Polarität des Gemisches, das DEV lag somit zwischen 3,2 : 1 (20% und 40% MeOH) und 3,8 : 1 (80% MeOH).

Bei früher unternommenen Vermessungen hydromethanolischer Auszüge desselben Drogenmaterials mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

(HPLC) waren Überlagerungen der Peaks der DicaFFEoylchinasäuren mit denen der Flavonoide beobachtet worden. Für die geplante Quantifizierung dieser Inhaltsstoffe war somit eine weitere Aufbereitung der Extrakte erforderlich.

Als probates Mittel zur Aufreinigung und Fraktionierung hat sich die Festphasenextraktion erwiesen. Dabei wird der Extrakt in gelöster Form auf eine mit Sorbens gefüllte Kartusche aufgebracht, seine Inhaltsstoffe gemäß ihrer Polarität mit geeigneten Lösungsmitteln unter Zuhilfenahme von Unterdruck eluiert und aufgefangen.

Auf diese Weise entstanden je Extrakt drei Sammelfractionen.

Die erste, nach Elution mit Wasser erhaltene, wurde ihrer Hauptkomponente entsprechend als „Chlorogensäure-Fraktion“ (CF) bezeichnet.

Die drei DicaFFEoylchinasäuren 3,4- DCCA, 3,5- DCCA und 4,5- DCCA konnten mithilfe von 20%-igem Methanol als „Säure-Fraktion“ (SF) gesammelt werden. Mit ihnen wurde jedoch auch noch ein polares Flavonoid, das Luteolin-7-O-glucuronid vom Sorbens gelöst. Eine Abtrennung dieser Substanz von den Säuren war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich, sie wurde daher gemeinsam mit den DCCAs quantifiziert, jedoch zu den, in einem anderen HPLC - Gradientensystem untersuchten, Flavonoiden hinzugezählt.

Zu den Hauptvertretern der im Schafgarbenkraut enthaltenen Flavonoide zählen neben den in geringeren Mengen enthaltenen Aglyka Luteolin, Apigenin und Quercetin, weiters die 7-O - Glucoside des Luteolins und des Apigenins, sowie das Luteolin-4'-O-glucosid und das Diglucosid Rutin, Mit 80% MeOH eluiert, wurden sie in der „Flavonoid-Fraktion“ (FF) angereichert.

Die Trocknungsrückstände der je Extrakt erhaltenen drei Fraktionen wurden gewogen, woraus für die Suche nach dem optimalen Extraktionsmittel weitere Erkenntnisse gewonnen werden konnten. So betragen jene der „Chlorogensäure-Fraktion“ nahezu zwei Drittel der Extraktauswaage, erwartungsgemäß war der Betrag bei 20% Methanol am höchsten.

Dem entgegengesetzt wurden für die „Flavonoid-Fraktion“ bei diesem Gemisch lediglich Extraktanteile von etwa 13,4% ermittelt, bei 80% Methanol lagen sie knapp unter 16%.

Da der Beitrag der Flavonoide im Schafgarbenkraut nur einen Bruchteil gegenüber dem der DicaFFEoylchinasäuren ausmacht, war für diese Substanzgruppe eine möglichst hohe Extraktionsrate im Hinblick auf die

geplante Quantifizierung der einzelnen Inhaltsstoffe erwünscht. Dennoch erwies sich gerade die apolarste der Methanol-Wasser-Mischungen in unseren Untersuchungen als problematisch (Kapitel 1.3.3.1.1, Seite 32 ff).

In beiden Parallelansätzen schien die Festphasenextraktion ihre Aufgabe der Trennung zu verfehlen, was sich im begleitend angefertigten Dünnschichtchromatogramm in zwei deutlich blauen Zonierungen im oberen Drittel der Laufstrecke erkennen ließ, welche im weiteren Verlauf der 3,5-DCCA und 4,5-DCCA zugeordnet werden konnten. Dementsprechend sind die für dieses Extraktionsmittelgemisch erhaltenen Fraktionsausbeuten als unsicher zu bewerten. Als weitere Konsequenz daraus wurden hier auch für die Quantifizierung nach HPLC-Vermessung Komplikationen erwartet.

Für die Erfassung der DicaFFEoylchinasäuren schienen ebenfalls die beiden mittleren Methanolkonzentrationen geeigneter zu sein. Bei ihnen machten die Trocknungsrückstände der „Säure- Fraktion“ jeweils etwas mehr als 15% des Extraktes aus, bei 20% MeOH nur 14,2%. Die ermittelten 11,5% für das lipophilste der Extraktionsmittel waren vermutlich in der bereits erwähnten, ungenügenden Auftrennung im Rahmen der Festphasenextraktion begründet.

Der Quantifizierung der einzelnen Inhaltsstoffe mittels HPLC hatte vor allem für die DicaFFEoylchinasäuren und die Chlorogensäure noch die Festlegung einiger Parameter voranzugehen. So musste für letztere beispielsweise eine Eichgerade erstellt werden. Dem Konzentrationsbereich der Linearität entsprechend sollte für die Vermessung die Aliquotierung der Fraktionsrückstände gewählt werden. Außerdem wurde die Reinheit der im Handel bezogenen und bei der HPLC-Analytik als externer Standard eingesetzten Chlorogensäure festgestellt. (Kapitel 1.1.4.2 ab Seite 14).

Für die Bestimmung der Inhaltsstoffe der „Säure-Fraktion“ wurde als interner Standard Cynarin (1,3-DCCA) verwendet. Diese Substanz fehlt in *Millefolii herba*, ist jedoch ein Strukturisomer der drei dort vorkommenden DicaFFEoylchinasäuren. Gerade diese Ähnlichkeit war ausschlaggebend für eine möglichst genaue Quantifizierung, da für keine der drei DCCAs isoliertes Material zur Bestimmung eines Korrekturfaktors (KF) zur Verfügung stand. Aufgrund des gleichen Molekulargewichtes jeder der Säuren und des Cynarins wurde zur Vereinfachung jeweils ein Korrekturfaktor von 1 angenommen.

Für das Luteolin-7-O-glucuronid bestand die gleiche Problematik, mangels Materialverfügbarkeit wurde hier zunächst das strukturell verwandte Luteolin-7-O-glucosid herangezogen. Neben der Ermittlung der Reinheit und einer Eichgeraden war die Feststellung des Korrekturfaktors gegenüber Cynarin geschehen. Das Ergebnis wurde rechnerisch durch die Annahme eines direkten Bezuges des Korrekturfaktors zum Molekulargewicht der jeweiligen Verbindung angepasst. Somit wurde für das Luteolin-7-O-glucuronid ein Korrekturfaktor von 0,877 bestimmt.

Die Hauptflavonoide sollten gegen den internen Standard Luteolin-3',7-di-O-glucosid vermessen werden. Die für die Quantifizierung erforderlichen Korrekturfaktoren und Eichgeraden für diese Substanzen lagen bereits vor (siehe Tabelle 5, Seite 17), so wie die Gradientensysteme für die DCCAs und die Flavonoide (Kapitel 1.1.4.2, Seite 14 ff; Benedek, 2007). Darauf abgestimmt wurden die Fraktionsrückstände für die Vermessung gelöst und aliquotiert.

Bei der Auswertung der erhaltenen HPLC-Chromatogramme traten zunächst die oben erwähnten erwarteten Komplikationen bei der Extraktion mit 80%igem Methanol auf, die im Dünnschichtchromatogramm der „Flavonoid-Fraktion“ sichtbaren DCCAs wurden auch dort registriert. Verifiziert wurde diese Annahme durch Vermessen einer „Säure-Fraktion“ im Flavonoid-Gradientensystem, die Übereinstimmung der Retentionszeiten diente als Bestätigung.

Eine Quantifizierung des in diese Fraktion durchgebrochenen Anteils an Säuren war ohne die Ermittlung eines Korrekturfaktors gegenüber dem hier verwendeten internen Standard nicht möglich, wegen des vorzeitigen Ausscheidens von 80% MeOH als für diese Methode geeignetes Extraktionsmittel jedoch auch nicht weiter von Bedeutung.

Interessanterweise kam es auch bei den Auszügen der entgegengesetzten, polarsten Methanollmischung zu derartigen Erscheinungen, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß. Vernachlässigbar klein waren sie für die beiden mittleren Konzentrationen. Dieser Umstand, sowie die in Kapitel 1.3.3.1.1 ab Seite 32 näher beschriebenen Ergebnisse dieser Vorversuche waren Grundlage für die Wiederholung der Tests bei gleichzeitiger Einschränkung auf diese beiden Mischungen.

Im Rahmen der als „Auswahl des geeigneten Extraktionsmittels“ bezeichneten (Kapitel 1.3.3.2, Seite 38 ff) Untersuchungen war neben der Feststellung der optimalen Methanolmischung auch eine Validierung der Bestimmungsmethode beabsichtigt. Beginnend bei der geschnittenen Droge wurde die Versuchsreihe dazu auf n = 6 Parallelansätze je Extraktionsmittel erweitert und nach erfolgter Drogenaufbereitung jede Fraktion per HPLC doppelt vermessen. Genaues Arbeiten während der zahlreichen Arbeitsschritte der Drogenaufbereitung sowie die Messgenauigkeit sollten auf diese Weise leichter überprüfbar werden.

Die Ergebnisse grob zusammenfassend machte die durchschnittliche Summe der in den drei Sammelfractionen aus *Millefolii herba* quantifizierten phenolischen Inhaltsstoffe (Chlorogensäure, DicaFFEoylchinasäuren und Flavonoide) bei 40% Methanol 2,74% bezogen auf die Gesamtdroge aus, bei 60% Methanol hingegen nur 2,66%.

Auffällig dabei war, dass bei 60%igem Methanol der Gehalt an Chlorogensäure (0,68%) höher war als beim polarerer Extraktionsmittel (0,65%), dafür der Wert für die Gesamtflavonoide darunter lag (0,46% bei 40%, 0,44% bei 60% Methanol). Die DicaFFEoylchinasäuren hingegen waren, den Erwartungen entsprechend, in der polarerer Mischung verhältnismäßig deutlich höher (1,63% der Gesamtdroge) als in der apolarereren vertreten (1,54%).

Graphisch soll die Abbildung 15 auf Seite 40 einen Überblick dazu vermitteln.

Für die vorrangige Erfassung der DCCAs wäre als Extraktionsmittel somit das Mischungsverhältnis aus 40 Teilen Methanol und 60 Teilen Wasser jedenfalls zu bevorzugen, auch wenn sich die Unterschiede in den Lösungseigenschaften der beiden untersuchten Gemische hier nicht mehr so deutlich ausdrücken.

Anhand dieser entwickelten Extraktions- und Aufbereitungsmethode konnte nun auch eine vergleichende Charakterisierung verschiedener Handelsmuster für die phenolischen Carbonsäuren und Flavonoide in Angriff genommen werden (Benedek, 2007; Rozema, 2006; Gjoncaj, 2007).

Aufgrund der wohl ursprünglichsten und weit verbreiteten Verwendung von Schafgarbenkraut in Form von wässrigen Auszügen (innerlich als Tee oder Dekokt, äußerlich für Umschläge, Spülungen oder Bäder) war das Ziel der

Aufbereitung und Quantifizierung einer Teezubereitung, einen Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen anstellen zu können.

Neben der Drogeneinwaage und der Extraktionsmethode wurde dafür lediglich die Aliquotierung der Fraktionsrückstände unmittelbar vor der HPLC-Vermessung variiert, nähere Details dazu sind in Kapitel 1.3.4 ab Seite 41 beschrieben.

Das DEV betrug hier 5 : 1, und die Summe der in den drei Sammelfractionen enthaltenen, qualifizierten Inhaltsstoffe ergab 0,72% (bezogen auf 1 Gramm Droge), wovon den Hauptanteil die DicaFFEoylchinasäuren mit 0,33% ausmachten, gefolgt von der Chlorogensäure mit 0,27% und nur 0,12% an Flavonoiden. Bemerkenswerterweise war hier die 3,5-DCCA mengenmäßig die kleinste Komponente der drei DicaFFEoylchinasäuren, wohingegen sie in sämtlichen hydromethanolischen Auszügen die bei weitem größte darstellte. Der prozentuelle Anteil der Flavonoide an der Gesamtsumme der qualifizierten Inhaltsstoffe im Tee entsprach in etwa den für die Methanolgemische ermittelten Werten, der der Chlorogensäure war beim wässrigen Auszug erwartungsgemäß höher.

Die Tatsache, dass bei der Extraktion mit 40% MeOH sowie 60% MeOH beinahe das Vierfache an Inhaltsstoffen gegenüber der Teezubereitung erfasst werden konnte, war einerseits auf die gesteigerte Lipophilie des Extraktionsmittels, andererseits jedoch auch auf die bewiesenermaßen vorteilhaftere Methode der unter Rückfluss durchgeführten Zweifachextraktion zurückzuführen.

In Abbildung 18 auf Seite 45 sind die Ergebnisse der Teezubereitung sowie der früher besprochenen hydromethanolischen Auszüge zusammengefasst.

Dementsprechend war auch die Herstellung des Großansatzes eines 20prozentigen methanolischen Extraktes zur Gewinnung der DicaFFEoylchinasäuren erfolgt. Etwa 1,3 Gramm dieser DCCA-Anreicherung waren gezielt für die später besprochenen, pharmakologischen Untersuchungen am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber (IPRL) bereits im Vorfeld dieser Arbeit gesammelt worden, jedoch unter etwas anderen Rahmenbedingungen (Kapitel 1.1.3 , Seite 11ff). Ein direkter Vergleich mit den für die Extraktion mit 20%igem Methanol erhaltenen Ergebnissen aus den

Vorversuchen (siehe Tabelle 10, Seite 33) wäre aufgrund der unterschiedlichen Vorgangsweise bei der Drogenaufbereitung nicht stichhaltig; festzustellen gäbe es nur, dass diesen gegenüber beim Großansatz etwas höhere Gehalte an Dicaffeoylchinasäuren ermittelt wurden. Die Quantifizierung der Inhaltsstoffe ergab für das Luteolin-7-O-glucuronid einen Anteil von 3,35% an dieser „Säurefraktion IPRL“ sowie für die DCCAs 48,84% (entsprechend 5,37% bezogen auf den Extrakt, 1,95% auf die Gesamtdroge) und stellte gleichermaßen den Abschluss der phytochemischen Analytik sowie die Überleitung zum pharmakologischen Teil dieser Diplomarbeit dar.

Neben den phytochemischen Arbeiten sollten hier auch pharmakologische Untersuchungen unternommen werden, um die choloretische Wirksamkeit und tradierte Anwendung als Leber- und Galletherapeutikum belegen zu können.

Ausschlaggebend dafür war die Annahme, dass der choloretische Effekt von Zubereitungen dieser Arzneipflanze vor allem in ihrem Gehalt an Caffeoylchinasäure-Derivaten begründet sein dürfte. Mit dem Modell der isoliert perfundierten Rattenleber (IPRL) war die Beobachtung der choloretischen Eigenschaften von Prüflösungen möglich geworden. Für unterschiedliche Zubereitungen der Artischocke (*Cynara scolymus* L.) waren bereits derartige Untersuchungen durchgeführt worden. Aus den Ergebnissen ging hervor, dass für die gallensekretionssteigernde Wirkung dieser Arzneipflanze in erster Linie die Dicaffeoylchinasäure-Derivate mit Cynarin als Hauptvertreter und in merklich geringerem Ausmaß auch das Monocaffeoylchinasäure-Derivat Chlorogensäure verantwortlich waren. Für das Luteolin-7-O-glucosid als Vertreter der in der Artischocke vorkommenden Flavonoide konnte hingegen keine choloretische Wirksamkeit beobachtet werden (Matuschowski, 1998, Flume, 2000). Auch wenn sich der Gesamteffekt additiv aus den Wirkungen der Monocaffeoyl- und Dicaffeoylchinasäuren zusammensetzt, so wird doch dem Cynarin dessen Hauptanteil zugeschrieben.

Die enge Strukturverwandtschaft der drei in *Achillea millefolium* L. s.l. vorkommenden Dicaffeoylchinasäuren (3,4-DCCA, 3,5-DCCA und 4,5-DCCA) zur 1,3-Dicaffeoylchinasäure Cynarin wurde bereits im phytochemischen Teil

erwähnt. Dieses war nicht nur dort eine probate Vergleichssubstanz für Dünnschichtchromatographie und HPLC-Analysen, sondern wurde auch an der IPRL der Säure-Fraktion aus *Millefolii herba* als Positivkontrolle gegenübergestellt.

Die Durchführung der Tests geschah in Zusammenarbeit mit dem *Institut für Pathophysiologie der Medizinischen Universität Wien*, wobei die Auswahl und Narkotisierung der Versuchstiere, die operative Entnahme der Organe, sowie Organisation und Überwachung des Untersuchungsablaufes von speziell geschultem Fachpersonal dieses Institutes unternommen wurde.

Als Perfusionsmedium wurde physiologischer Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer (glucosefrei) bestimmt, dessen Zusammensetzung und Bereitung wurde in Kapitel 1.2.1 auf Seite 21 beschrieben.

Da es sich um die ersten Tests dieser Art für die Schafgarbe handelte, der zeitliche Rahmen begrenzt war, und auch von der zu prüfenden „Säurefraktion IPRL“ nur eine sehr begrenzte Menge an Material zur Verfügung stand (vgl. Kapitel 1.2.1), war eine kleine Zahl von Versuchen vorgesehen: drei Perfusionsläufe pro Prüfsubstanz, in denen jeweils drei, sich verdoppelnde Konzentrationen beobachtet wurden.

Die Feststellung der geeigneten Lösungsmittel für Cynarin und die „Säurefraktion IPRL“ war gefolgt von den Vorversuchen, die einerseits der Überprüfung und Optimierung der gewählten Konzentrationen, andererseits auch der des Perfusionsaufbaues dienten (Kapitel 1.4.2.1 Seite 48 ff).

So hatten wir für die Fraktion der Schafgarbe eine wesentlich geringere Wirksamkeit als für das Cynarin erwartet, die drei Konzentrationsstufen dementsprechend hoch gewählt, was sich als vermutlich zu stark konzentriert erwies. Für Cynarin hingegen war zunächst sogar ein Abfall des Gallenflusses zu beobachten. Erst mit der nächsthöheren Konzentration (10 mg/Liter) konnte überhaupt ein Anstieg registriert werden, demgemäß hatte eine Dosiserhöhung zu erfolgen.

Weiters waren durch die direkten Wechsel zur jeweils höheren Konzentration zwar positive oder negative Auswirkungen auf den Gallenfluss erkennbar, allerdings aufgrund der möglichen Kumulation keine Rückschlüsse auf die konkrete Dosis-Wirkung-Beziehung möglich. Durch zehnmünütige Auswaschphasen mit reinem Krebs-Henseleit-Puffer zwischen den Perfusionen

der Prüflösungen wurde in den nachfolgenden Versuchen jeweils ein neues Ausgangsniveau ermittelt, von dem aus die Berechnung des Gallenflussanstieges für die folgende Konzentration erfolgen konnte. Erwähnenswert scheint in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass nach den Ergebnissen der Vorversuche und zugunsten besserer Vergleichbarkeit die gleichen Einwaagen für die beiden Prüfsubstanzen gewählt wurden, Cynarin lag dabei als Reinsubstanz (> 96%) vor, die DCCAs der „Säurefraktion IPRL“ machten hingegen nur etwa die Hälfte der Einwaage aus.

Zusammenfassend fielen die Untersuchungen der DicaFFEoylChinasäuren an dem Modell der isoliert perfundierten Rattenleber unerwartet deutlich zugunsten der als „Säurefraktion IPRL“ bezeichneten Anreicherung aus dem *Achillea*-Extrakt aus, auch wenn die Anzahl der Versuche mit $n = 3$ für präzise Interpretationen am unteren Limit lag (Kapitel 1.4.2.2 ab Seite 52).

Die Testung der Auswirkung auf den Gallenfluss lieferte durchwegs positive Ergebnisse, wobei die Fraktion mit in Summe etwa 48,84% DCCAs die als choleretisch wirksam bewiesene Reinsubstanz Cynarin bei weitem übertraf. So lag beispielsweise der Anstiegswert für 10 mg Fraktion pro Liter bei +14,65%. Für Cynarin konnte jedoch erst mit 20 mg/l ein Maximalwert von +15,92% erreicht werden, der Mittelwert lag gar nur bei +7,98% gegenüber dem Ausgangsniveau. Einen Überblick über die durchschnittlichen Maximalwerte sowie die nach zehnminütiger Perfusion errechneten Anstiegswerte der Prüfsubstanzen liefert die Abbildung 24 auf Seite 56.

Beginnend mit Cynarin fällt beim Vergleich auf, dass die Mittelwerte bei 20 mg/l und 40 mg/l etwa die Hälfte der Maximalwerte betragen. Bei 10 mg/l macht der Durchschnittsanstieg sogar weniger als ein Drittel des beobachteten Zuwachses aus.

Für die DCCAs aus *Achillea millefolium* L. s.l. waren die Werte nicht nur generell deutlich höher, sondern die Mittelwerte nach zehn Minuten lagen auch näher an den Maximalwerten, sie betragen zwischen 63% und nahezu 72% des Spitzenanstiegs.

Die Standardabweichungen von den Durchschnittswerten sind bei pharmakologischen Versuchen unter *ex vivo* Bedingungen erwartungsgemäß größer als beispielsweise bei chemisch-analytischen Bestimmungen. Dennoch

wurde hier, auch ethischen Überlegungen folgend, die Versuchsanzahl bewusst gering gehalten.

Verglichen mit anderen, am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber durchgeführten, Arbeiten (Semmelmayer, 2005) bot der zeitliche Rahmen dieser Diplomarbeit leider keine Gelegenheit zu weiterführenden Untersuchungen der Galle, obgleich nach diesen vielversprechenden Ergebnissen eine Vertiefung der Analysenmethode in Richtung Metabolitenbestimmung durchaus erstrebenswert wäre. Eine Fraktionierung der sezernierten Gallenflüssigkeit mit anschließender Bestimmung der Zusammensetzung sowie eine Analyse des Organs nach entsprechender Aufbereitung wären Ansatzpunkte, die zusätzliche interessante Ergebnisse liefern könnten.

Wesentlich wären natürlich auch noch Untersuchungen über den, nach oraler Applikation im Blut zur Verfügung stehenden Anteil an wirksamen Inhaltsstoffen oder Metaboliten aus *Achillea*-Zubereitungen. Eine gewisse Säurestabilität konnte für die DicaFFEoylchinasäuren bereits nachgewiesen werden (Wimmer, 2003).

Mit einer entsprechenden Fortführung der pharmakologischen Untersuchungen von *Achillea millefolium* L. s.l. könnten zukünftig vielleicht noch weitere wesentliche Beiträge zum Verständnis der Wirksamkeit der DicaFFEoylchinasäuren geleistet werden.

5. Zusammenfassung

Die hier beschriebenen Untersuchungen verstehen sich als Fortsetzung und Teil der intensiven Forschungsarbeit des Departments für Pharmakognosie zum Thema *Achillea millefolium* L. s.l. und können grob in einen phytochemischen und einen pharmakologischen Abschnitt geteilt werden.

Im phytochemischen Teil dieser Diplomarbeit sollte im Anschluss an Vorgängerarbeiten für die im Schafgarbenkraut vorkommenden, phenolischen Inhaltsstoffe ein entsprechendes Extraktionsmittel gefunden werden, welches sowohl die sehr polaren Caffeoylchinasäure-Derivate als auch die weniger polaren Flavonoide in ausreichenden Mengen erfassen würde.

Zunächst wurden vier hydromethanolische Mischungen untersucht. Die Aufreinigung und Fraktionierung der Extrakte erfolgte mittels Festphasenextraktion, parallel dazu angefertigte Dünnschichtchromatogramme sollten lediglich der Kontrolle dienen.

Auf diese Weise wurden für jedes Gemisch drei Sammelfaktionen erhalten, die nach ihren Hauptkomponenten als „Chlorogensäure-“, „Säure-“ und „Flavonoid- Fraktion“ bezeichnet wurden.

Die Quantifizierung der jeweiligen Inhaltsstoffe geschah mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), wobei für die Dicaffeoylchinasäuren und die Flavonoide interne Standards verwendet wurden. Für die „Chlorogensäure-Fraktion“ diente die Reinsubstanz als externer Standard. Die auf einem Gemisch aus Acetonitril und Wasser basierenden Gradientensysteme für die einzelnen Fraktionen waren bereits im Vorfeld erarbeitet worden.

Im Sinne einer Validierung wurde nach den Vorversuchen eine Einschränkung auf die beiden mittleren Konzentrationen bei Erweiterung der Testreihe auf $n = 6$ Ansätze je Methanolgemisch beschlossen. Als weitere Maßnahme zur Erhöhung der Aussagekraft und Genauigkeit der Daten sollte die HPLC-Doppelbestimmung jeder Fraktion dienen.

Bei komplikationslosem Verlauf lieferten die derartig durchgeführten Analysen adäquate Ergebnisse, was als Bestätigung für die Nutzbarkeit der entwickelten Methode bei zukünftigen Untersuchungen anhand verschiedener Musterproben anzusehen wäre.

Aufgrund der vielfachen Anwendung von *Millefolii herba* in Form von wässrigen Auszügen wurden mit dieser Methode auch die in einer Teezubereitung enthaltenen Mengen an Inhaltsstoffen ermittelt.

Den Abschluss des phytochemischen Teiles stellte die Quantifizierung der „Säurefraktion IPRL“ dar, einer als Großansatz eigens zur Verfügung gestellten Anreicherung der DicaFFEoylchinasäuren aus einem hydromethanolischen Extrakt.

Mit dem pharmakologischen Teil dieser Arbeit folgten die Beobachtungen des Gallenflusses am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber (IPRL), durchgeführt am *Institut für Pathophysiologie der Medizinischen Universität Wien*.

Aufgrund der Strukturverwandtschaft der drei, in *Achillea millefolium* L. s.l. enthaltenen DicaFFEoylchinasäuren (3,4-, 3,5-, 4,5-DCCA) zu dem bereits mehrfach als positiv choleretisch beschriebenen Cynarin (1,3-DCCA) sollte die „Säurefraktion IPRL“ diesbezüglich im direkten Vergleich anhand von drei, sich jeweils verdoppelten Konzentrationen untersucht werden. Aus Gründen begrenzt zur Verfügung stehender Substanzmengen und bei Tierversuchen immer auch zu berücksichtigender Ethik wurde die Anzahl der Versuche mit $n = 3$ je Prüfsubstanz festgesetzt.

Bei gleicher Einwaage konnten für die Fraktion aus der Schafgarbe Gallenflussanstiege beobachtet werden, die ein Vielfaches der für Cynarin beobachteten Werte ausmachten

Die hier beschriebenen pharmakologischen Testungen stellten die ersten dieser Art für die Schafgarbe dar. Mit den einheitlich positiven Ergebnissen waren nicht nur die Erwartungen übertroffen, sondern auch neue, grundlegende Erkenntnisse für die choleretische Wirksamkeit der in einem Auszug von *Millefolii herba* enthaltenen DicaFFEoylchinasäuren erbracht worden.

6. Literatur

- Benedek B. (2007): *Achillea millefolium* L. s.l. – Analysis of Phenolic Compounds and Biological Testing; Dissertation, Universität Wien
- Benedek B., Gjoncaj N., Saukel J., Kopp B. (2007) Distribution of Phenolic Compounds in Middleeuropean Taxa of the *Achillea millefolium* L. Aggregate; Chemistry and Biodiversity, Vol. 4, 849-857
- Europäisches Arzneibuch (2005): 5. Auflage, Verlag Österreich
- Flume M. (2000): Choleretische Aktivität verschiedener Zubereitungen und Fraktionen aus *Cynara scolymus* L. in der isoliert perfundierten Rattenleber; Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Genaust H. (1996): Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen; 3., vollständig überarb. und erw. Aufl., Birkhäuser Verlag, Basel Boston Berlin
- Gjoncaj N. (2007): Phytochemical analysis of phenolic compounds in different *Achillea* species; Diplomarbeit, Universität Wien
- Glasl S., Kastner U., Jurenitsch J., Kubelka W. (1999); Qualitative and quantitative determination of sesquiterpenoids in *Achillea millefolium* species by reversed-phase High-performance liquid chromatography, mass-spectrometry and thin layer chromatography; J Chromatogr. B Biomed Sci Appl.: 729 (1-2): 361-368
- Hänsel R., Sticher O. (2004): Pharmakognosie - Phytopharmazie; 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg:

- Jäger W., Gehring E., Hagenauer B., Aust S., Senderowicz A., Thalhammer T. (2003): Biliary excretion of flavopiridol and its glucuronides in the isolated perfused rat liver: role of multidrug resistance protein 2 (Mrp2); *Life Sci.* 73 (22): 2841-2854
- Jurenitsch J. (1992): Achillea; in Hänsel R., Keller K., Rimpler H., Schneider G. (Eds): *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*; Springer Verlag, Berlin
- Kastner U., Glasl S., Jurenitsch J. (1995): *Achillea millefolium* – ein Gallentherapeutikum?; *Z. f. Phytotherapie*; 16: 34-36
- Kastner U., Sosa S., Tubaro A., Breuer J., Rücker G., Della Loggia L., Jurenitsch J. (1993): Anti-Edematous Activity of Sesquiterpene Lactones from Different Taxa of the *Achillea millefolium* Group; *Planta Med.* 59, (Suppl.) Issue A699
- Kirchhoff R., Beckers Ch., Kirchhoff G.M., Trinczek-Gärtner H., Petrowicz O., Reimann H.J. (1994): Increase in choleresis by means of artichoke extract; *Phytomedicine* 1: 107-115
- Lemmens-Gruber R., Marchart E., Rawnduzi P., Engel N., Benedek B., Kopp B. (2006): Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoids in yarrow (*Achillea millefolium* s.l.) on isolated guinea-pig ilea; *Arzneimittelforschung/Drug research* 56: 582-588
- Matuschowski P. (1998): Beitrag zur Pharmakologie und Wirkstoff-Findung von *Cynara scolymus* L.; Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Nemetz A. (2003): Methoden zur Auftrennung und Analytik der Flavonoide und phenolischen Carbonsäuren in Vertretern des *Achillea millefolium* aggr.; Diplomarbeit, Universität Wien

- Pittler M.H., Ernst E. (1998): Artischoke leaf extract for serum cholesterol reduction; *Perfusion* 11; 1998: 338-340
- Rauchensteiner F., Nejati S., Werner I., Glasl S., Saukel J., Jurenitsch J., Kubelka W. (2002): Determination of Taxa of the *Achillea millefolium* group and *Achillea crithmifolia* by morphological and phytochemical methods I. Characterization of Central European taxa; *Sci Pharm* 70: 199-230
- Ring Ch. (2000): Beiträge zur mathematischen Modellierung der hepatischen Pharmakokinetik; Dissertation, Martin Luther Universität, Halle-Wittenberg
- Rothwangl - Wiltschnigg K. (2004): Analytik der Sesquiterpene zur Prüfung der pharmazeutischen Qualität von Schafgarbe; Dissertation, Universität Wien
- Rozema E. (2006): Phytochemical analysis of phenolic compounds in commercial samples of *Achillea millefolium* L. s.l.; Diplomarbeit, Universität Wien
- Semmelmayr P. (2005): Die antioxidative Wirkung von Melatonin in der isoliert perfundierten Rattenleber; Diplomarbeit, Universität Wien
- Simic N.R., Palic R., Vajs V., Milosavljevic S., Djokovic D. (2002): Composition and antibacterial activity of *Achillea asplenifolia* essential oil; *J. Essent. Oil Res.* 14: 76-78
- Trauner G. (2004): Über die DicaFFEoylchinasäuren in *Herba Millefolii*; Diplomarbeit, Universität Wien
- Wagner H., Blatt S., Zgainski E.M. (1983): Drogenanalyse; Springer Verlag Berlin Heidelberg

Wegener T., Fintelmann V. (1999): Pharmacological properties and therapeutic profile of artichoke (*Cynara scolymus* L.); Wien Med. Wochenschr. 149: 241-247

Willuhn G. (2002): Millefolii herba; in: Wichtl M. (Ed): Teedrogen und Phytopharmaka; 4. Auflage, Wiss. Verl.-Ges.mbH, Stuttgart: 399-403

Wimmer B. (2003): Untersuchung phenolischer Inhaltsstoffe in *Herba Millefolii*; Diplomarbeit, Universität Wien

Choleretic effects of yarrow (*Achillea millefolium* s.l.) in the isolated perfused rat liver

B. Benedek^a, N. Geisz^a, W. Jäger^b, T. Thalhammer^c, B. Kopp^{a,*}

^aDepartment of Pharmacognosy, University of Vienna, PharmaCenter Vienna, Althanstraße 14, A-1090 Vienna, Austria

^bDepartment of Clinical Pharmacy and Diagnostics, University of Vienna, PharmaCenter Vienna, Althanstraße 14, A-1090 Vienna, Austria

^cDepartment of Pathophysiology, Medical University of Vienna, Währinger Gürtel 18-20, A-1090 Vienna, Austria

Abstract

Different species from the *Achillea millefolium* aggregate are used against gastrointestinal and hepato-biliary disorders in traditional European medicine. In this work, a fraction enriched in dicaffeoylquinic acids (DCCAs) and luteolin-7-*O*- β -D-glucuronide was investigated on its choleretic effect in the isolated perfused rat liver (IPRL) compared to cynarin (1,3-DCCA), the main choleretic compound of *Cynara scolymus* L. A fraction containing 3,4-, 3,5- and 4,5-DCCA and luteolin-7-*O*- β -D-glucuronide was prepared by solid phase extraction from a 20% methanolic extract of yarrow. A total amount of 48.8% DCCAs and 3.4% luteolin-7-*O*- β -D-glucuronide was determined by HPLC analysis with cynarin as internal standard. IPRL experiments revealed a dose-dependant increase in bile flow (23–44–47%) by the *Achillea* fraction. Choleresis was two- to three-fold higher than that of cynarin. The combined effect of DCCAs and luteolin-7-*O*- β -D-glucuronide stimulated bile flow more effectively than the single compound cynarin. Due to their polar structure, these compounds are quantitatively extracted into teas and tinctures; hence, they seem to be the choleretic active principles in the traditional application forms of yarrow.

© 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: *Achillea millefolium* s.l.; Dicaffeoylquinic acids; Choleresis; Isolated perfused rat liver

Introduction

Different species from the *Achillea millefolium* aggregate are used in traditional European medicine as infusions and tinctures against gastrointestinal and hepato-biliary disorders due to their antiphlogistic, spasmolytic and antimicrobial properties (Willuhn, 2002; Jurenitsch, 1992). While the antiphlogistic activity is mediated by sesquiterpenes (Kastner et al., 1993; Sosa et al., 2001), flavonoids are described as the antispas-

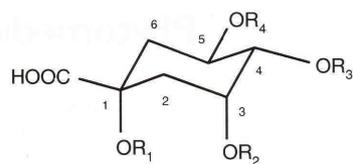
modic compounds (Lemmens-Gruber et al., 2005), and the essential oil and sesquiterpenes exhibit antimicrobial effects (Simic et al., 2002). However, the choleretic principles of yarrow are still unknown.

Extracts from artichoke leaves are widely used in the treatment of hepato-biliary dysfunction and digestive complaints. Mono- and dicaffeoylquinic acids (DCCAs, Fig. 1) and flavonoids as the main phenolic constituents of *Cynara scolymus* L. are reported to have choleretic, hepatoprotective and cholesterol-lowering effects (Wegener and Fintelmann, 1999). A standardised artichoke extract showed a considerable increase in bile secretion in a randomised placebo-controlled double-blind study (Kirchhoff et al., 1994). Furthermore, in the isolated

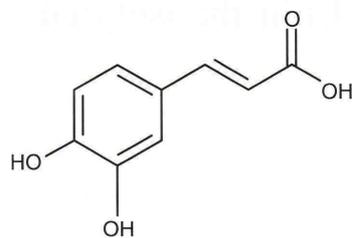
*Corresponding author. Tel.: +43 1 42 77 55 255;

fax: +43 1 42 77 95 52.

E-mail address: brigitte.kopp@univie.ac.at (B. Kopp).



Quinic acid: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$



Caffeic acid (CA)

	R_1	R_2	R_3	R_4
Cynarin	CA	CA	H	H
3,4-DCCA	H	CA	CA	H
3,5-DCCA	H	CA	H	CA
4,5-DCCA	H	H	CA	CA

Fig. 1. Structures of dicaffeoylquinic acids from yarrow and cynarin.

perfused rat liver (IPRL) cynarin (1,3-DCCA) and other DCCAs besides monocaffeoylquinic acids and flavonoids were reported to be the choleric active principles in artichoke leaves (Matuschowski, 1998).

As yarrow is traditionally applied similar to artichoke and contains a considerable amount of DCCAs as well, a fraction enriched in those phenolcarboxylic acids and luteolin-7-*O*- β -D-glucuronide was prepared and tested in the IPRL in order to examine its effect on bile flow. As a positive control we used cynarin, the main choleric constituent of *C. scolymus* L. (Fig. 1).

Material and methods

Plant material

A commercial sample of the aerial parts of yarrow (*A. millefolium* s.l.) supplied by Aboca, Sansepolcro, Italy (sample 1D5787), was used for the preparation of the plant extract. A voucher specimen (Aboca 1) is deposited at the Department of Pharmacognosy, University of Vienna.

Preparation of the extract

Twenty-five grams of the powdered drug were extracted with 1500 ml 20% (v/v) methanol p.a. for

30 min under reflux, followed by centrifugation. For exhaustive extraction, the residue was treated in the same way for another 20 min. Methanol was removed from the combined extracts by evaporation under reduced pressure at 40 °C. The remaining aqueous solution was lyophilised and yielded 9.1 g crude extract, giving a drug–extract ratio of 2.7:1.

In order to obtain a fraction enriched in DCCAs, the extract was dissolved in 270 ml 20% (v/v) methanol in an ultrasonic bath for 10 min. Twenty millilitres of the solution were applied to a C18-cartridge (Varian, Mega BE-C18, 10 g, 60 ml), previously conditioned with 2 reservoir volumina (RV) methanol and 2 RV deionised water. After purging with air for 10 min, the extract was eluted at a flow rate of 8 ml/min with 4 RV deionised water, followed by 4 RV 20% (v/v) methanol and 4 RV 80% (v/v) methanol, respectively. This procedure was repeated several times in order to fractionate the whole extract. From the combined 20% (v/v) methanol fractions methanol was evaporated under reduced pressure at 40 °C, and the remaining aqueous solution was lyophilised, affording 1.3 g of a fraction.

Analysis of the extract

To 4.2 mg of the fraction obtained by solid phase extraction 200 μ l of internal standard solution (1.04 mg in 1 ml methanol) were added and diluted to 1.00 ml with 20% (v/v) methanol. The solution was centrifuged, and 10 μ l were injected repeatedly onto the HPLC column.

Analysis of the fraction was performed by HPLC on a Perkin Elmer Series 200 instrument equipped with a column oven and an UV/VIS detector set at a wavelength of 345 nm. As stationary phase a 5 μ Hypersil BDS C18 (250 \times 4 mm) column was used, the mobile phase consisted of water adjusted to pH 2.8 with acetic acid (A) and acetonitrile (HPLC-grade, Riedel-de Hen, purchased from Sigma-Aldrich) containing 0.8% acetic acid (B). Gradient elution was performed starting with 16% B at 0.1%/min for 20 min at a flow rate of 1.2 ml/min and a temperature of 25 °C (Fig. 2).

Quantification of the DCCAs and the flavonoid luteolin-7-*O*- β -D-glucuronide was carried out by internal standardisation with cynarin (Sequoia Research Products, Oxford, UK; purity >96%). As the DCCAs contained in the sample are structural isomers of the internal standard cynarin, we used a calibration factor of 1 for all of them. As luteolin-7-*O*- β -D-glucuronide is not commercially available, a calibration curve with the internal standard cynarin and luteolin-7-*O*- β -D-glucoside (Extrasynthese, Genay, France; purity >98%) instead of the glucuronide was established. We found linear correlation from 0.059 to 0.297 mg/ml with a correlation coefficient of 0.9993. The calibration factor

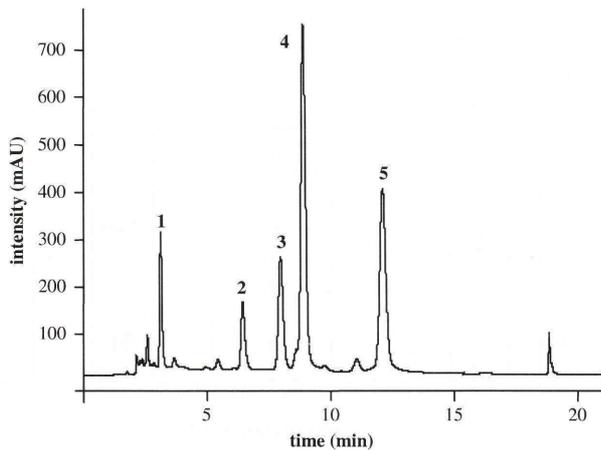


Fig. 2. HPLC analysis of a fraction enriched in dicaffeoylquinic acids [3,4-DCCA (3), 3,5-DCCA (4), 4,5-DCCA (5)] and luteolin-7- β -D-O-glucuronide (2) from a commercial *Achillea* sample with cynarin (1) as internal standard on a 5 μ Hypersil BDS C18 (250 \times 4 mm) column by gradient elution with acetonitrile/H₂O (pH 2.8) and detection at 345 nm.

was calculated, taking into account the molecular weight of luteolin-7-O- β -D-glucoside and -glucuronide, as 0.877.

Liver perfusion

Male Sprague-Dawley rats (body weight: 180–270 g; liver weight: 11.4–15.4 g) were purchased from the Department of Animal Research and Genetics of the Medical University of Vienna. Animals were housed in a temperature- and humidity-controlled room under a 12 h light–dark cycle with free access to water and food.

Liver perfusion experiments were carried out as described before (Jäger et al., 2003) on animals anaesthetised with phenobarbital according to the protocol approved by the committee of the institution. Before the excision of the liver, glass canulas for the influent perfusate were applied in the portal vein, for the effluent perfusate in the vena cava inferior. For the collection of bile, a canula was inserted into the bile duct.

The excised liver was transferred to a chamber where it was kept constantly at 37 °C. Perfusion was carried out in a single pass system at a constant flow rate of 35 ml/min using freshly prepared Krebs Henseleit bicarbonate–CO₂ buffer (KHB) pH 7.4 (118 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 2.75 mM CaCl₂, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.18 mM MgSO₄ and 25 mM NaHCO₃). The buffer was equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂ during the whole procedure. The perfusion pressure was constantly monitored by measuring the water pressure. Single bile drops falling from the bile duct canula were weighed (approximately 8 mg) in order to determine the bile flow

by measuring the time interval between drops. The bile flow rate is expressed in μ l/g_{liver}/min.

The basal flow was determined by equilibrium perfusion with pure KHB for 30 min. Then 5, 10 and 20 mg of the *Achillea* fraction were diluted in KHB giving final concentrations of 10, 20 and 40 mg/l. Livers were perfused with those solutions for 10 min each, followed by intervals of 10 min purging with pure KHB. The increase in bile flow was expressed in percentage of the basal value.

Cynarin was used as a positive control. A stock solution of 120 mg in 6 ml ethanol was prepared and added to the perfusion medium to give final concentrations of 10, 20 and 40 mg/l. The perfusion procedure was carried out under identical conditions as mentioned above for the *Achillea* fraction.

Statistics

For statistical analysis, the arithmetic mean and standard error of the mean (SEM) of three individual experiments were calculated. Differences of $p < 0.01$ were regarded as statistically significant.

Results and discussion

As shown in Fig. 2, HPLC analysis of the fraction prepared by eluting the *Achillea* extract with 20% (v/v) methanol from C18-cartridges revealed a total amount of 48.8% DCCAs (7.9% 3,4-DCCA, 24.2% 3,5-DCCA and 16.7% 4,5-DCCA) and 3.4% luteolin-7- β -D-O-glucuronide besides other minor compounds that could not be identified because of their small amount in the fraction. Due to its polar structure the flavonoid luteolin-7- β -D-O-glucuronide eluted together with the DCCAs. The remaining flavonoids, present in the crude plant extract, were eluted with 80% (v/v) methanol from the C18-cartridges, whereas chlorogenic acid, also a major compound of the crude extract, was eluted with water, thus not being present in the tested fraction.

As shown previously for the phenolic constituents from artichoke (Matuschowski, 1998), the DCCAs are the main choleric active principles. In particular, cynarin revealed an increase in bile flow of 20% at a concentration of 5.7 mg and a perfusion rate of 1 ml/g_{liver}/min which corresponds to our results. Monocaffeoylquinic acids contribute to the choleric activity to a minor extent whereas the flavonoid luteolin-7- β -D-O-glucoside exhibited no significant effect on bile flow which explains that this study focussed on the DCCAs from yarrow.

In the liver perfusion experiments both, the *Achillea* fraction and cynarin, showed a dose-dependant increase in bile flow in the tested concentration range. Fig. 3

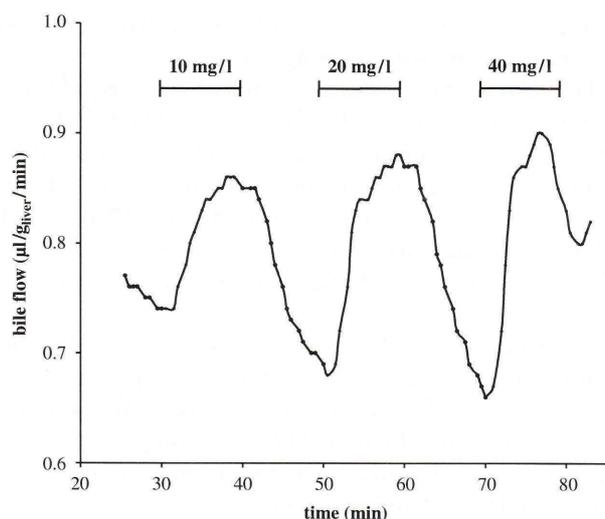


Fig. 3. Bile flow ($\mu\text{l}/\text{g}_{\text{liver}}/\text{minute}$) in the isolated perfused rat liver after 30 min equilibrium perfusion with pure KHB followed by 10, 20 and 40 mg/l *Achillea* fraction (10 min each) and purging with pure KHB between applying the different concentrations.

shows the course of bile flow after 30 min equilibrium perfusion with pure KHB followed by application of increasing concentrations (10, 20, 40 mg/l; 10 min each) of *Achillea* fraction with intervals of 10 min purging with pure KHB. A dose-dependant increase in bile flow of 23.1% (± 6.9), 44.1% (± 17.2) and 47% (± 12.2) by the *Achillea* fraction was observed. Compared to the single compound cynarin, which was applied in the same concentrations, showing an increase in bile flow of 5.1% (± 2.0), 15.9% (± 3.6) and 21.6% (± 8.9), the *Achillea* fraction exhibited a two- to three-fold higher increase ($p < 0.01$) in bile flow (Fig. 4).

Candidates for the observed choleric effect of the *Achillea* fraction are the above-mentioned DCCAs, amounting to 48.8% in the tested fraction, due to their structural similarity to the choleric active DCCAs from *C. scolymus* L. Since they are not commercially available and difficult to isolate, no experiments with the pure compounds could be carried out. The DCCAs from yarrow seem to act synergistically, thus stimulating bile flow much more effective than the single compound cynarin. The flavonoid luteolin-7- β -D-O-glucuronide being also present in the fraction might also contribute to the choleric effect.

Due to their polar structure, mono- and DCCAs are extracted almost quantitatively into infusions and tinctures, the traditional application forms of yarrow in traditional European medicine. While the results obtained in this study indicate the choleric effect of the DCCAs, it is also known that chlorogenic acid exerts an increase in bile flow (Matuschowski, 1998). Since all those phenolcarboxylic acids are present in yarrow with a total amount of about 2.5%, we strongly believe that they are the main choleric active principles in yarrow,

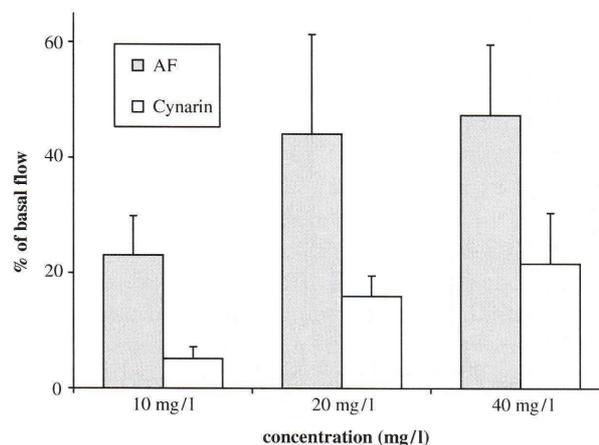


Fig. 4. Increase in bile flow by different concentrations of *Achillea* fraction (AF, $n = 3$) and cynarin ($n = 3$) expressed in % of the basal flow.

thus justifying the traditional application in case of hepato-biliary disorders.

Moreover, a randomised placebo-controlled double-blind cross-over study revealed an increase in choleresis up to 51.5% after oral intake of a standardised artichoke extract containing 0.38% caffeoylquinic acid derivatives, therefrom 0.16% DCCAs and 0.06% cynarin which corresponds to a daily intake of 7 mg caffeoylquinic acids in total and 1.1 mg cynarin, respectively (Kirchhoff et al., 1994). In contrary, we investigated a tea preparation from yarrow and found a caffeoylquinic acid content of 10 mg per cup, therefrom 7.5 mg DCCAs. Considering the recommended dosage of three cups of tea, a daily intake of 22.5 mg DCCAs is reached, thus leading to the conclusion that tea preparations from yarrow might exert a considerable increase in bile flow.

Furthermore, we suggest a standardisation of phyto-pharmaceuticals containing yarrow with regard to the content of DCCAs, the compounds responsible for the choleric effect. As described above, we established a HPLC method that allows a rapid analysis of the DCCAs by internal standardisation with cynarin.

In conclusion, this is the first time an in vitro choleric effect of yarrow has been shown. Hence, a choleric activity can be considered also in humans after oral intake of preparations containing yarrow due to the phenolcarboxylic acid content. Taking into account the low risk of side effects and the further beneficial therapeutic effects like spasmolytic and antiphlogistic activity, yarrow preparations might be appropriate especially for long-term treatment of digestive disorders.

References

- Jäger, W., Gehring, E., Hagenauer, B., Aust, S., Senderowicz, A., Thalhammer, T., 2003. Biliary excretion of flavopiridol

- and its glucuronides in the isolated perfused rat liver: role of multidrug resistance protein 2 (Mrp2). *Life Sci.* 73, 2841–2854.
- Jurenitsch, J., 1992. *Achillea*. In: Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider, G. (Eds.), *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*. Springer, Berlin, pp. 45–54.
- Kastner, U., Sosa, S., Tubaro, A., Breuer, J., Rücker, G., Della Loggia, R., Jurenitsch, J., 1993. Anti-edematous activity of sesquiterpene lactones from different taxa of the *Achillea millefolium* group. *Planta Med.* 59 (Suppl.), A669.
- Kirchhoff, R., Beckers, Ch., Kirchhoff, G.M., Trinczek-Gärtner, H., Petrowicz, O., Reimann, H.J., 1994. Increase in choleresis by means of artichoke extract. *Phytomedicine* 1, 107–115.
- Lemmens-Gruber, R., Marchart, E., Rawnduzi, P., Engel, N., Benedek, B., Kopp, B., 2005. Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoids in yarrow (*Achillea millefolium* s.l.) on isolated guinea-pig ilea. *Fitoterapi*, submitted for publication.
- Matuschowski, P., 1998. Beitrag zur Pharmakologie und Wirkstoff-Findung von *Cynara scolymus* L. Ph.D. Thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Simic, N., Palic, R., Vajs, V., Milosavljevic, S., Djokovic, D., 2002. Composition and antibacterial activity of *Achillea asplenifolia* essential oil. *J. Essent. Oil Res.* 14, 76–78.
- Sosa, S., Tubaro, A., Kastner, U., Glasl, S., Jurenitsch, J., Della Loggia, R., 2001. Topical anti-inflammatory activity of a new germacrane derivative from *Achillea pannonica*. *Planta Med.* 67, 654–658.
- Wegener, T., Fintelmann, V., 1999. Pharmacological properties and therapeutic profile of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Wien Med. Wochenschr.* 149, 241–247.
- Willuhn, G., 2002. Millefolii herba. In: Wichtl, M. (Ed.), *Teedrogen und Phytopharmaka*. Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, pp. 399–403.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Name: Nora Geisz
Geburtsdatum: 26.04.1976
Geburtsort: Wien
Staatsbürgerschaft: Österreich
Religionsbekenntnis: römisch-katholisch

Ausbildung:

1982 - 1986 Volksschule Roseggergasse, 2380 Perchtoldsdorf
1986 - 1994 Gymnasium St. Ursula, 1238 Wien
1994 - 2008 Studium der Pharmazie an der Universität Wien
WS 2004 / 05 Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie

Berufliche Tätigkeiten:

15.07.1996 – 14.08.1996
01.07.1997 – 31.07.1997
27.07.1998 – 23.08.1998 Ferialarbeit
17.07.2000 – 13.08.2000 Apotheke Zur Heiligen Martha
01.07.2001 – 29.07.2001 1150 Wien
15.07.2002 – 25.08.2002
14.07.2003 – 17.08.2003

18.01.1999 – 31.08.2003 Roessler Kulturservice GmbH, 1010 Wien
01.09.2003 – 28.02.2007 Roessler Kulturservice – Martina Schrei, 1010 Wien

SS 2005 Tutorenstelle, Pharmakognostische Übungen II
WS 2005 / 06 – SS 2007 Tutorenstelle, Gewinnung und instrumentelle
Analytik biogener Arzneimittel

ab 01.04.2008 Georg Apotheke, 2340 Mödling