



universität
wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

Untersuchungen zur Wirkung von *Valeriana officinalis* L. s.l.

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat.)

Verfasserin:	Gabriele Trauner
Matrikel-Nummer:	9907164
Dissertationsgebiet (lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuerin:	Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Brigitte Kopp

Wien, im Februar 2009

DANKSAGUNG

Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch danke ich für die Ermöglichung der Durchführung meiner Dissertation am Department für Pharmakognosie der Universität Wien.

Weiters möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. Brigitte Kopp für die Möglichkeit meine Dissertation am Department für Pharmakognosie durchführen zu können sowie die interessante und vielfältige Themenstellung und die wissenschaftliche Betreuung herzlich bedanken.

Ich danke auch allen Mitarbeitern des Departments, vor allem Frau Dr. Birgit Benedek, Frau Dr. Sonja Prinz, Frau ao. Prof. Dr. Liselotte Krenn sowie Frau DI Stanimira Krasteva für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit und die ständige Hilfsbereitschaft bei Problemen.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering und Frau Mag. Sophia Khom, Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien bedanke ich mich für die Durchführung der GABA_A-Rezeptor-Messungen.

Frau Univ.-Prof. Dr. Hilke Winterhoff und Herrn Dr. Miguel Hattesoehl, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster sowie Frau Ass. Prof. Dr. Veronika Butterweck, Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida gilt besonderer Dank für die Durchführung und Auswertung der EPM-Versuche.

Herrn ao. Prof. Dr. Walter Jäger, Frau Dr. Alexandra Maier-Salamon und Frau Mag. Romy Hiltcher, Department für klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien, danke ich für die Durchführung der Metabolismus-Studie.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Christian R. Noe und bei Herrn DI. Dr. Winfried Neuhaus, Department für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, Universität Wien, bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit sowie die wissenschaftliche Diskussion und ständige Hilfestellung bei Fragen und Problemen im Zuge der Transportstudien.

Ass. Prof. Dr. Hanspeter Kaehlig, Institut für Organische Chemie, Universität Wien danke ich herzlich für die Aufnahme und Hilfe bei der Interpretation der NMR-Spektren.

Besonders großer Dank gilt Ruxandra Popescu, die mich immer wieder aufgemuntert, unterstützt und ermutigt und viel Freude in den (Labor)alltag gebracht hat, Theresa Eggenbauer für die ständige Bereitschaft, das Zuhören und das Verständnis bei Problemen sowie allen Freunden, die mich in jeglicher Weise unterstützt haben.

Christian Ruckensteiner danke ich ganz besonders für die Unterstützung in jeder Hinsicht sowie die ständige Aufmunterung, Ermutigung und Geduld vor allem beim Verfassen dieser Arbeit.

Zuletzt danke ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern, für die Ermöglichung des Studiums und die stetige Unterstützung während dieser Zeit.

URHEBERRECHT

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Gabriele Trauner

ABKÜRZUNGEN

AVS	Acetoxyvalerensäure
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CH ₃ CH	Acetonitril
DA	Diazepam
DC	Dünnschichtchromatographie
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
EA	Ethylacetat-Extrakt
EEG	Elektroenzephalogramm
EPM	Elevated Plus Maze Test
ESEM	Environmental Scanning Electronmicroscopy
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
EuAB	Europäisches Arzneibuch
GABA	γ -Aminobuttersäure
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatography
HVS	Hydroxyvalerensäure
I _{GABA}	durch GABA induzierter Cl ⁻ -Strom
ISTD	interner Standard (= Dantron)
MeOH	Methanol
ÖAB	Österreichisches Arzneibuch
PE	Permeabilitätskoeffizient
PE _{stand}	standardisierter Permeabilitätskoeffizient
RV	Reservoirvolumen
SC	Säulenchromatographie
SEM	Scanning Electronmicroscopy (Rasterelektronenmikroskopie)
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
STS	Sesquiterpensäuren
TEER	transendothelialer elektrischer Widerstand
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
VLC	Vacuum-Liquid-Chromatography
VS	Valerensäure
ZNS	Zentralnervensystem

INHALT

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>VALERIANA OFFICINALIS</i> L. S.L.	2
1.1.1	Therapeutische Wirksamkeit	10
1.1.2	Pharmakologische Wirkung (bisherige Forschungsergebnisse)	14
1.2	ZIELSETZUNG	18
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	MATERIAL	20
2.2	EXTRAKTION	22
2.2.1	Extraktion zur Herstellung unterschiedlich polarer Extrakte	22
2.2.2	Extraktion für die Isolierung von Reinsubstanzen	22
2.3	CHROMATOGRAPHIE	24
2.3.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	24
2.3.2	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	25
2.3.3	Vacuum Liquid Chromatography (VLC)	28
2.3.4	Säulenchromatographie (SC)	29
2.4	KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR)	30
2.5	PHARMAKOLOGISCHE TESTUNG	31
2.5.1	Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	31
2.5.2	Elevated Plus Maze Test	33
2.6	PERMEABILITÄTSSTUDIEN DURCH EIN BLUT-HIRN-SCHRANKEN-MODELL	35
2.7	PHARMAKOKINETIK	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	BIOASSAY-GUIDED FRAKTIONIERUNG UND PHYTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG	39
3.1.1	Analyse verschieden polarer Extrakte	39
3.1.2	Semiquantitative Bestimmung des GABA-Gehalts in den Extrakten	48
3.1.3	Abtrennung von GABA mittels Ionenaustauschchromatographie	51
3.1.4	Anreicherung der Sesquiterpensäuren mittels VLC	55
3.1.5	Isolierung von Sesquiterpensäuren aus <i>Valerianae radix</i>	58
3.1.6	Testung der Valerensäure und Hydroxyvalerensäure am GABA _A -Rezeptor	72
3.2	WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN	76
3.2.1	Permeation der Sesquiterpensäuren durch ein Blut-Hirn-Schranken-Modell	76

3.2.2	Studien zur Metabolisierung von Valerensäure	90
3.2.3	Elevated Plus Maze Test	92
4	DISKUSSION	98
5	ZUSAMMENFASSUNG	107
6	SUMMARY	109
7	LITERATUR	111
	ANHANG	119
	CURRICULUM VITAE	125

1 EINLEITUNG

In den westlichen Industrieländern leiden 20 - 30 % der Bevölkerung an Schlafstörungen, depressiven Verstimmungen, nervösen Angst-, Spannungs- und Unruhezuständen oder anderen psychovegetativen Störungen. Vor allem die Zahl der Patienten, die von Ein- und Durchschlafstörungen betroffen ist, nimmt immer häufiger zu. Diese beinhalten die Symptome verzögertes Einschlafen, mehrmaliges Aufwachen in der Nacht, frühmorgendliches Erwachen, zu geringe Schlaftiefe sowie unruhigen Schlaf. Die Ursachen eines gestörten Schlafes sind vielgestaltig, es können primäre organische Erkrankungen oder Störungen vorliegen, häufig sind aber sekundäre Ursachen wie Stress, Angst, Schmerzen, Licht- und Lärmeinwirkung der Grund. Daraus resultieren vermindertes körperliches und geistiges Wohlbefinden, beeinträchtigte Leistungsfähigkeit wie z.B. Konzentrationsmangel, Stimmungsschwankungen, aber auch eine Schwächung des Immunsystems wodurch wiederum andere Erkrankungen entstehen können.

Zwar stellen Schlafstörungen und andere psychovegetative Erkrankungen keine vitale Bedrohung dar, jedoch die Lebensqualität der betroffenen Patienten wird erheblich vermindert. Eine Therapie solcher Störungen nimmt in der Medizin einen immer zentraleren Platz ein.

Die pharmazeutische Industrie entwickelte eine Reihe synthetischer Pharmaka zur Behandlung von Schlafstörungen, depressiven Verstimmungen und Unruhezuständen. Zurzeit sind vor allem Tranquillantien, Hypnotika, Antidepressiva und Neuroleptika in Verwendung. Allerdings sind mit der Einnahme dieser Arzneimittel auch beträchtliche Nebenwirkungen verbunden: Neben Tagesmüdigkeit („hang over“), eingeschränkter Vigilanz, Depressivität und Verwirrtheit, kommt es vor allem zu einem Gewöhnungseffekt und damit zur Abhängigkeit.

Die Behandlung neurovegetativer Störungen mit Phytopharmaka bietet eine gute Alternative zu synthetischen Präparaten. Pflanzliche Arzneimittel mit sedierenden und schlafanstoßenden Eigenschaften haben den Vorteil, dass ihre Nebenwirkungen im Vergleich zu synthetischen Psychopharmaka weitaus geringer sind und auch kein Abhängigkeitspotential bekannt ist.

Im Handel befinden sich neben Präparaten, die Pflanzenextrakte aus *Humulus lupulus*, *Melissa officinalis* und *Passiflora incarnata* enthalten, vor allem solche mit Extrakten aus *Valeriana officinalis* L. s.l., dem Baldrian, um alleine oder in Kombination oben genannte Beschwerden zu behandeln. Auch in Teemischungen und Tinkturen findet die Arzneidroge Verwendung (Species sedativae ÖAB, Valerianae tinctura EuAB).

1.1 *Valeriana officinalis* L. s.l.

Valeriana officinalis L. s.l., der offizinelle Baldrian, gehört zur Familie der Valerianaceae. Es handelt sich um eine Sammelart, die sich in mehrere morphologisch, zytologisch und phytochemisch unterschiedliche Kleinarten gliedert (Titz et al. 1982, Reichling 2007). Derzeit werden vier Grundtypen unterschieden:

- Grundtyp „*exalta*“: diploide Pflanzen, hochwüchsig, ohne Ausläufer, viele Stengelblattpaare, Fiederblätter breit gezähnt
- Grundtyp „*collina*“: tetraploide Pflanzen, kleinwüchsig, mit Ausläufern, wenige Stengelblattpaare, Fiederblätter kaum gezähnt
- Grundtyp „*procurrens*“: oktaploide Pflanzen, hochwüchsig, kräftige Ausläufer, wenige Stengelblattpaare, breite Fiederblätter, gezähnt
- Grundtyp „*sambucifolia*“: oktaploide Pflanzen, kleinwüchsig, kräftige Ausläufer, wenige Stengelblattpaare, breite Fiederblätter, gezähnt

Übergangsformen vermitteln zwischen diesen Typen (Titz et al. 1982, Wichtl 2003). Je nach Kleinart zeigt die Pflanze einen Habitus von 30 – 150 cm Größe mit gegenständigen, unpaarig gefiederten oder fiederschnittigen Blättern und weiß oder rosa Blüten in Trugdolden. Das kurze, vertikale Rhizom bildet zusammen mit den Faserwurzeln, die sich in alle Richtungen verzweigen, die unterirdischen Teile. Je nach Unterart können auch Ausläufer vorhanden sein (Wichtl 2003, Reichling 2007).



Abbildung 1: *Valeriana officinalis* L. s.l. (Department für Pharmakognosie, Universität Wien)

Als Droge *Valerianae radix*, deren Monographie im Europäischen Arzneibuch vertreten ist, werden die schonend getrockneten, ganzen oder geschnittenen, unterirdischen Teile von *Valeriana officinalis* L. s.l. verlangt. Die Droge umfasst den Wurzelstock, die Wurzeln sowie die Ausläufer.

Während die frische Droge weitgehend geruchlos ist, entwickelt sich beim Trocknungsvorgang ein charakteristischer Geruch, der vor allem durch frei werdende Isovaleriansäure entsteht (Reichling 2007).

Neben *Valeriana officinalis* L. s.l. zählen *Valeriana edulis* NUTT. ex TORR. et GRAY ssp. *procera* (*Valeriana mexicana* DC), der mexikanische Baldrian, *Valeriana jatamansi* JONES (*Valeriana walichii* DC), der indische Baldrian und *Valeriana fauriei* BRIQ, der japanische Baldrian zu aussereuropäischen, drogenliefernden Arten, die allerdings Unterschiede im Spektrum der Inhaltsstoffe aufweisen (Hänsel und Schulz 1982, Houghton 1997, Navarette et al. 2006).

Inhaltsstoffe

Folgende Inhaltsstoffe wurden bisher aus der Wurzel und dem Rhizom isoliert und charakterisiert:

- Ätherisches Öl (0,1 – 2,0 %) (Morazzoni und Bombardelli 1995, Titz et al. 1983)
- Cyclopentan Sesquiterpene (0,05 – 0,8 %) (Stoll und Seebeck 1957)
- Iridoide (Valepotriate) (0,8 – 1,7 %) (Thies 1966)
- Lignane (Bodesheim und Hölzl 1997, Schuhmacher et al. 2002)
- Flavonoide (Fernandez et al. 2004, Marder et al. 2003)
- Alkaloide (Torsell und Wahlberg 1966, Gross et al. 1971)
- Aminosäuren, Phenolcarbonsäuren, freie Fettsäuren, Kohlenhydrate

Das ätherische Öl setzt sich aus einer Mischung von Monoterpenen und Sesquiterpenen zusammen. Zu den Monoterpenen zählen Borneol sowie dessen Ester Bornylacetat und Bornylisovalerat. Weiters wurden u.a. Campher, Camphen, 1,8-Cineol, α -Pinen und Myrcen identifiziert (Stoll et al. 1957, Titz et al. 1983, Houghton 1997).

Die in *Valerianae radix* enthaltenen oxygenierten Sesquiterpene werden je nach Struktur des Grundgerüsts in drei Gruppen eingeteilt: Valerenal-, Kessan- und Eleman-Derivate.

Zu den Valerenal-Derivaten zählen Valerenal, Valerenol, Valerenylacetat, Valerenylisovalerat, Valerenylvalerat und Valerenylhexanoat (Bos et al. 1986). Kessan, Kessylacetat und Kessylglycol wurden als Vertreter der Kessan-Derivate identifiziert, Valeranon sowie Cryptofaurinol zählen zu den Eleman-Derivaten. Weiters sind Faurinon, Patchoulialkohol,

β -Bisabolen und α -Curcumen enthalten (Bos et al. 1986, Morazzoni und Bombardelli 1995, Houghton 1997). Die hier angeführten Komponenten zählen zu den mengenmäßig vorherrschenden im ätherischen Öl der Baldrianwurzel. Insgesamt wurden über 150 Komponenten des ätherischen Öls identifiziert (Bos et al. 1997, Reichling 2007). Der Gehalt und das Spektrum der einzelnen Komponenten können allerdings große Unterschiede zeigen (Bos et al. 1997, Titz et al. 1983, Houghton 1997).

In der Monographie des Europäischen Arzneibuchs „*Valerianae radix*“, wird als Qualitätskriterium ein Mindestgehalt an ätherischem Öl verlangt. Dieser beträgt 4 ml/kg für die ganze Droge und 3 ml/kg für die geschnittene Droge.

Zum Valerenal-Typ zählen auch die Cyclopentan-Sesquiterpene, bei denen es sich um Sesquiterpensäuren handelt. Die Vertreter Valerensäure und Acetoxyvalerensäure sind charakteristische Inhaltsstoffe für *Valeriana officinalis* L. s.l. und werden daher zur Identitätsprüfung eingesetzt. Nach neueren Untersuchungen sind diese Substanzen aber auch in anderen Valeriana Arten, wie z.B. *Valeriana angustifolia*, *Valeriana montana* oder *Valeriana pyrenaica* zu finden (Bos et al. 1997). Hydroxyvalerensäure könnte ein Artefakt der Acetoxyvalerensäure darstellen (Bos et al. 1996, Bos et al. 1998).

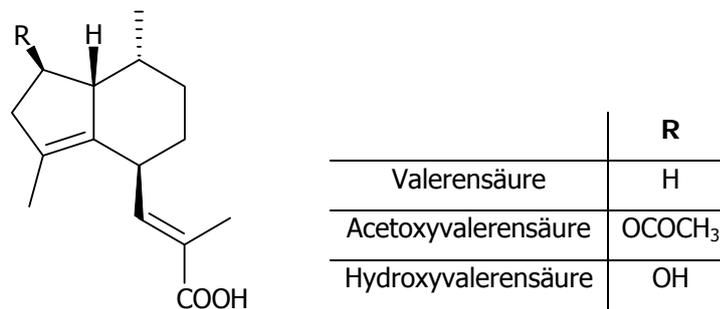


Abbildung 2: Cyclopentan-Sesquiterpsäuren

Kürzlich wurden weitere Derivate dieser Gruppe, 3 β ,4 β -Epoxyvalerensäurederivate, isoliert und identifiziert (Dharmaratne et al. 2002).

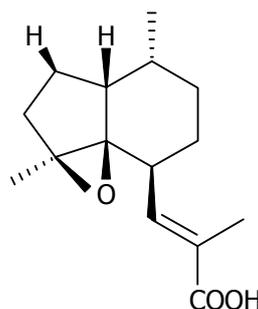


Abbildung 3: 3 β ,4 β -Epoxyvalerensäure

Im Europäischen Arzneibuch wird auch der Gehalt an schwerflüchtigen Sesquiterpensäuren als Qualitätskriterium herangezogen. Dieser muss mindestens 0,17 % für die ganze Droge und 0,10 % für die geschnittene Droge, berechnet als Valerensäure, betragen.

In anderen drogenliefernden *Valeriana* Arten, wie *Valeriana edulis* und *Valeriana wallichii*, sind diese Substanzen nicht enthalten (Navarette et al. 2006, Hänsel und Schulz 1982).

Eine wichtige Gruppe der Inhaltsstoffe in *Valeriana* radix sind Iridoide, die als **Valeriana-Epoxytriester** (Valepotriate) bezeichnet werden. Man unterscheidet dabei strukturell zwischen Monoen-Valepotriaten und Dien-Valepotriaten. Während Dien-Valepotriate zwei Doppelbindungen im Isopren-Grundgerüst enthalten, fehlt Monoen-Valepotriaten eine Doppelbindung (siehe Abbildung 4). Das Iridoid-Grundgerüst kann mit Essig-, Isovalerian-, β -Methylvalerian-, α -Isovaleroxyisovalerian-, α -Acetoxyisovalerian-, Isocapron-, β -Acetoxy- β -methylvalerian- und β -Hydroxyisovaleriansäure verestert sein.



Monoen-Valepotriate	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Didrovaltrat	Iv	Ac	Iv	H
Homodidrovaltrat	Ic	Ac	Iv	H
IVHD-Valtrat	Iv	Ac	Iiv	OH

Dien-Valepotriate	R ₁	R ₂	R ₃
Valtrat	Iv	Iv	Ac
Isovaltrat	Iv	Ac	Iv
Homovaltrat	Iv	Ic	Ac
Acevaltrat	Iv	Aiv	Ac

Iv = Isovaleryl-; Ac = Acetyl-, Ic = Isocapryl-, Iiv = 2-Isovaleroxy-isovaleryl-, Aiv = Acetoxyisovaleryl-

Abbildung 4: Monoen- und Dien-Valepotriate

Die Hauptvertreter der Valepotriate in *Valeriana officinalis* L. s.l. sind Valtrat und Isovaltrat, die zur Gruppe der Diene gehören (vgl. Abbildung 4). Weitere Vertreter sind Homovaltrat und Acevaltrat. Daneben kommen die Monoene Dihydrovaltrat, Isovaleroxyhydroxydidrovaltrat (IVHD-Valtrat) und Homodidrovaltrat vor (Thies und Funke 1966, Titz et al. 1982). Auch ein Glukosid (Valerosidatum) wurde isoliert, das im Iridoidgrundgerüst als R₃ Glukose gebunden hat (Abbildung 5, Seite 6).

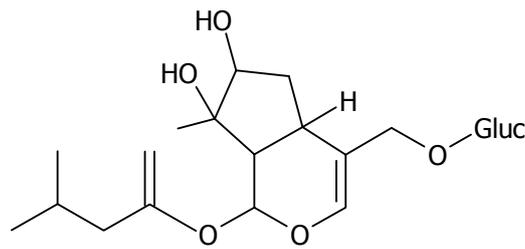
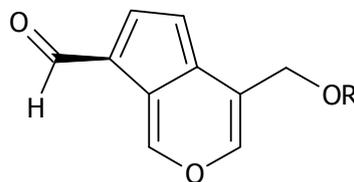


Abbildung 5: Valerosidat

Valepotriate sind aufgrund ihrer zyklischen Acetalstruktur relativ instabile Verbindungen. Daher werden in üblichen galenischen Arzneizubereitungen häufig Abbauprodukte gefunden. Die wichtigsten Vertreter sind Baldrinal und Homobaldrinal.



Baldrinal	R = Acetyl-
Homobaldrinal	R = Isovaleryl-
Desacylbaldrinal	R = H

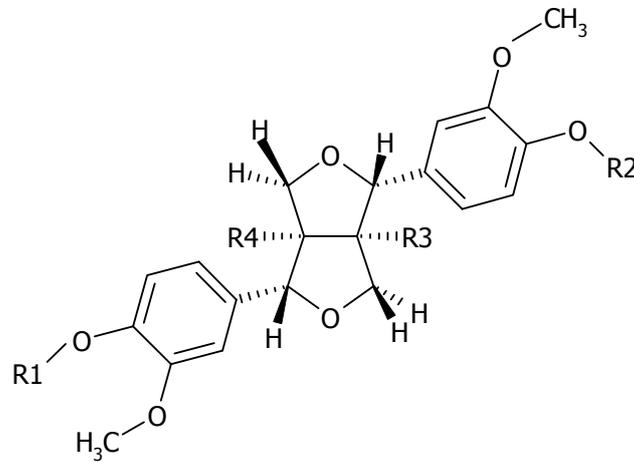
Abbildung 6: Baldrinale

Daneben wurden Desacylbaldrinal, Valtroxal, Valtral, Isovaltral, Valtrat-Hydrine und andere Polykondensate identifiziert (Schneider und Willems 1982, Bos et al. 1998, Goppel 2003, Denee et al. 1979).

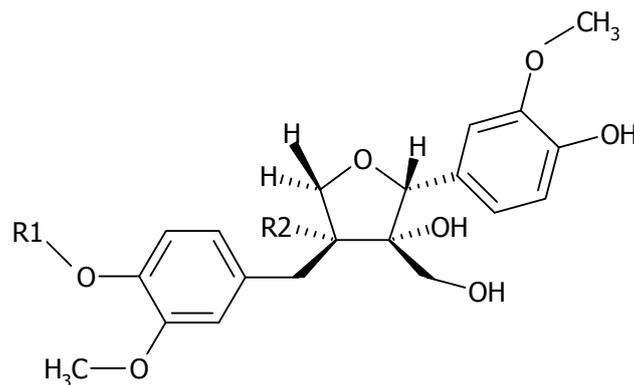
Valeriana edulis und *Valeriana walichii* enthalten einen höheren Gehalt an Valepotriaten. Die Zusammensetzung und die Menge der einzelnen Komponenten unterscheiden sich von *Valeriana officinalis* L. s.l.: *Valeriana edulis* enthält 5 bis 8 % der Verbindungen mit einem hohen Anteil an Valtrat, Isovaltrat und Didrovaltrat. Von *Valeriana jatamansi* gibt es zwei chemische Rassen - eine enthält Valtrat als Hauptkomponente, die andere Didrovaltrat. Der Gesamt-Valepotriatgehalt liegt zwischen 3 % und 6 % (Hölzl 1975, Tittel et al. 1978, Reichling 2007).

In *Valerianae radix* sind auch Lignane enthalten. Bisher wurden die Diepoxy-Lignane Pinoresinol, 8-Hydroxypinoresinol, Prinsepiol, Pinoresinol-4-O- β -D-glukosid, Pinoresinol-4,4'-di-O- β -D-glukosid, 8-Hydroxypinoresinol-4'-O- β -D-glukosid, 8-Hydroxypinoresinol-4-O- β -D-

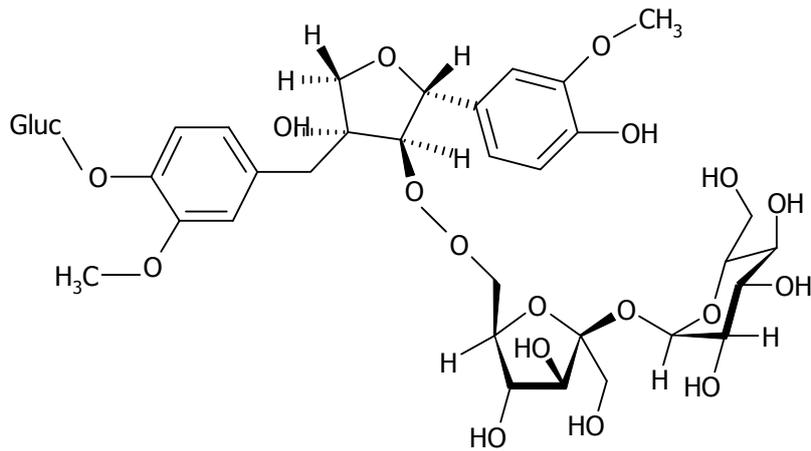
glukosid (Bodesheim und Hölzl 1997) und die Monoepoxy-Lignane Massoniresinol-4'-O- β -D-glukosid, Berchemol-4'-O- β -D-glukosid und 4'-O- β -D-Glukosyl-9-O-(6''-desoxysaccharosyl)olivil (vgl. Seite 8) isoliert und identifiziert (Schuhmacher et al. 2002).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Pinoresinol	H	H	H	H
Pinoresinol-4-O- β -D-glukosid	H	β -D-Glukose	H	H
Pinoresinol-4,4'-di-O- β -D-glukosid	β -D-Glukose	β -D-Glukose	H	H
8-OH-Pinoresinol	H	H	OH	H
8-OH-Pinoresinol-4'-O- β -D-glukosid	β -D-Glukose	H	OH	H
8-OH-Pinoresinol-4-O- β -D-glukosid	H	β -D-Glukose	OH	H
Prinsepiol	H	H	OH	OH



	R ₁	R ₂
Massoniresinol-4'-O- β -D-glukosid	β -D-Glukose	OH
Berchemol-4'-O- β -D-glukosid	β -D-Glukose	H



4'-O-β-D-Glukosyl-9-O-(6''-desoxysaccharosyl)olivil

Abbildung 7: Mono- und Diepoxy-Lignane

Auch Flavonoide wurden identifiziert. Linarin, 6-Methylapigenin, Hesperidin (vgl. Abbildung 8 und Abbildung 9) sind in *Valerianae radix* enthalten (Fernandez et al. 2004, Marder et al. 2003).

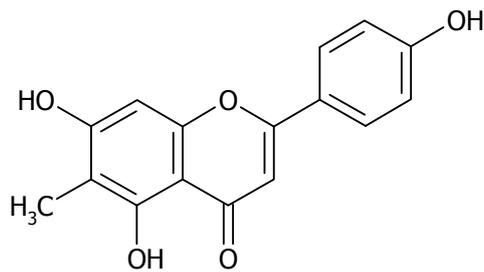


Abbildung 8: 6-Methylapigenin

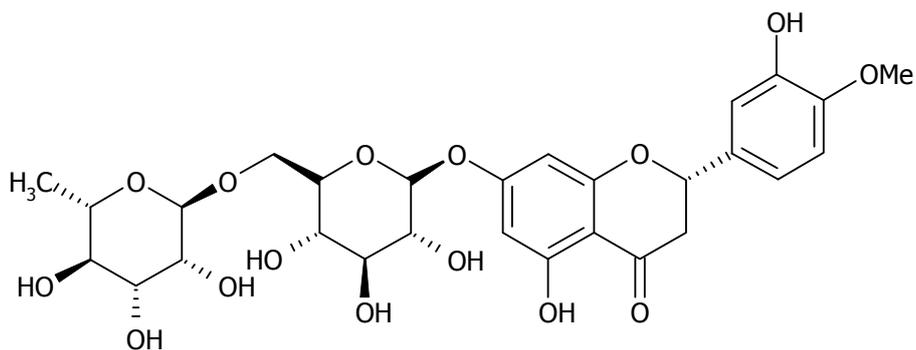


Abbildung 9: 2S (-)-Hesperidin

Weitere bisher bekannte Inhaltsstoffe stellen die Alkaloide dar. Neben dem Valeriana Haupt- und Nebenalkaloid (Torsell und Wahlberg 1966) ist Actinidin, ein Monoterpenalkaloid, ein weiterer Vertreter (Gross et al. 1971).

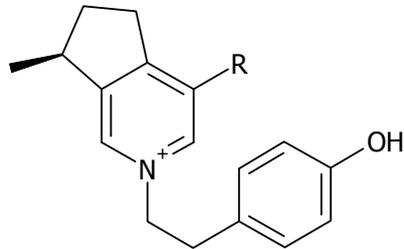


Abbildung 10: Valeriana Haupt- (R = H) und Neben-Alkaloid (R = OH)

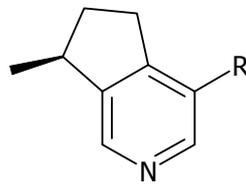


Abbildung 11: Actinidin (R = CH₃)

Neben Glutamin, Arginin, Serin, Aspartat, Glutamat, Valin, Phenylalanin, Leucin und Isoleucin wurde auch γ -Aminobuttersäure (GABA) in einer Konzentration von 4,56 mM nachgewiesen (Hänsel und Schulz 1981, Santos et al. 1994).

Weitere Inhaltsstoffe der Droge sind die Phenolcarbonsäuren Chlorogensäure, Kaffeesäure und trans-Hesperidinsäure (Stoll und Seebeck 1957).

Freie Fettsäuren (Öl-, Linol-, Linolensäure u.a.) und Kohlenhydrate (Stärke, Fructose, Glucose, Saccharose, u.a.) liegen in geringen Mengen vor.

Die Gesamtmenge sowie das Spektrum der Inhaltsstoffe können allerdings je nach Kleinart, Anbauklima und Erntebedingungen variieren (Bos et al. 1998).

Traditionelle und therapeutische Anwendung

Der Baldrian als Arzneipflanze wird schon seit langer Zeit in der Volksmedizin bei diversen Beschwerden wie Schlaflosigkeit, nervöse Erschöpfung, Konzentrationsschwäche, Stress, Reizbarkeit, geistige Überarbeitung, Angst- und Spannungszuständen, Hysterie, nervöse Herzleiden, Erregungszuständen, Magenkrämpfe, Koliken und Uterusspasmen angewendet. Allerdings sind nicht alle dieser Anwendungsgebiete wissenschaftlich belegt (Houghton 1999, Hölzl 1997, Dweck 1997, Morazzoni und Bombardelli 1995, Hölzl 1996, Wichtl 2003, Reichling 2007).

Die Kommission E (Bundesanzeiger Nr. 90, 1985) empfiehlt die Anwendung der Droge „bei Unruhezuständen und nervös bedingten Einschlafstörungen“. In der Monographie der ESCOP werden als Indikationen „vorübergehende, leicht nervöse Anspannungen und/oder Einschlafstörungen“ angegeben (ESCOP 2003). Die Ergebnisse von publizierten klinischen Studien bestätigen im Großen und Ganzen diese Indikationen (siehe Kapitel 1.1.1).

Heute gibt es eine Reihe pharmakologischer Untersuchungen und klinischer Studien zu Baldrianwurzel-Zubereitungen und daraus hergestellten Einzelstoffen, auf Grund derer eine Wirksamkeit belegt werden kann (siehe Kapitel 1.1.2, Seite 14).

1.1.1 Therapeutische Wirksamkeit

Tabelle 1 enthält eine Übersicht von 14 bisher veröffentlichten Studien, im Zuge derer die Wirksamkeit verschiedener Mono-Präparate aus *Valerianae radix* (Kombinationspräparate mit anderen pflanzlichen Extrakten wurden in der Tabelle nicht angeführt) an Probanden untersucht wurde.

Die Ergebnisse sind kontrovers, allerdings sollten bei der Interpretation sowohl die verschiedenen Extraktzubereitungen als auch die Art und Durchführung der Studien selbst mit einbezogen werden.

Autoren, Jahr	Extrakt	Dosis, Behandlungsdauer	Anzahl der Probanden	Studien-Design	Ergebnis
Leathwood et al. 1982	wässrig (DEV 3:1)	400 mg akut	128	randomisiert doppelblind, Plazebo-kontrolliert, cross-over	signifikante Verbesserung der Schlafqualität, Verkürzung der Schlaflatenz
Leathwood und Chauffard 1982	wässrig (DEV 3:1)	400 mg akut	10	randomisiert Plazebo-kontrolliert, cross-over	verkürzte Einschlafatenz

Leathwood und Chauffard 1985	wässrig (DEV 3:1)	450 mg, 900 mg akut	8	randomisiert Plazebo-kontrolliert, doppelblind	signifikante Verkürzung der Einschlafzeit
Balderer und Borbley 1985	wässrig (DEV 3:1)	450 mg, 900 mg akut	18	Plazebo-kontrolliert, doppelblind, cross-over	signifikante Reduktion der Schlafzeit und Wachzeit
Schulz et al. 1994	wässrig alkoholisch (DEV 5-6:1)	400 mg akut bzw. 7 d	14	Plazebo-kontrolliert, doppelblind	Zunahme des langweiligen Schlafs (Schlafstadium 3 und 4)
Donath et al. 2000	70 % EtOH (DEV 5:1)	600 mg akut bzw. 14 d	16	randomisiert Plazebo-kontrolliert, doppelblind, cross-over	Schlafeffizienz verbessert, slow-wave-Latenzzeit verkürzt, kein Unterschied zu Plazebo
Dorn 2000	70 % EtOH	600 mg 28 d	75	randomisiert doppelblind, zweiarmig, vs. Oxazepam	Schlafqualität und Befindlichkeit signifikant verbessert
Ziegler et al. 2002	70 % EtOH (DEV 3-6:1)	600 mg 6 Wochen	202	randomisiert doppelblind, zweiarmig, vs. Oxazepam	signifikant verbesserte Schlafqualität
Diaper und Hindmarch 2004	70 % EtOH (DEV 3-6:1)	300 mg, 600 mg akut	16	Plazebo-kontrolliert, doppelblind, cross-over	keine Verbesserung schlafspezifischer Parameter
Kamm-Kohl und Jansen 1984	70 % EtOH (DEV 3-6:1)	270 mg 7d bzw. 14 d	80	Plazebo-kontrolliert, doppelblind	signifikante Verbesserung von Ein- und Durchschlaf-Störungen
Cropley et al. 2002	70 % EtOH (DEV 5:1)	600 mg 7 d	54	Plazebo-kontrolliert	signifikante Verringerung von Stressreaktionen
Kuhlmann et al. 1999	70 % EtOH (DEV 3-6:1)	600 mg akut bzw. 14 d	102	Plazebo-kontrolliert, randomisiert doppelblind vs. Flunitrazepam	keine signifikante Verbesserung der Schlafqualität
Gutierrez et al. 2004	70 % EtOH (DEV 3-6:1)	600 mg, 1200 mg, 1800 mg akut	10	Plazebo-kontrolliert, randomisiert doppelblind, cross-over vs. Diazepam	keine Beeinträchtigung psychomotorischer oder kognitiver Fähigkeiten
Hallam et al. 2003	70 % EtOH (DEV 4:1)	500 mg bzw. 1000 mg, akut	9	Plazebo-kontrolliert, randomisiert doppelblind, cross-over, vs. Triazolam	keine Beeinträchtigung psychomotorischer oder kognitiver Fähigkeiten

Tabelle 1: Übersicht und Zusammenfassung klinischer Studien mit relevanten Parametern

In einigen Studien (Leathwood et al. 1982, Leathwood und Chauffard 1982, Leathwood und Chauffard 1985, Balderer und Borbley 1985) wurden wässrige Extrakte (DEV 3-7:1) in Dosierungen von 400 mg, 450 mg bzw. 900 mg verabreicht. Die Behandlungsdauer erfolgte akut, also in einer einmaligen Gabe der Dosis. Es handelte sich um randomisierte, Plazebo-kontrollierte Doppelblindstudien. Es wurde eine signifikante Verbesserung der subjektiv bewerteten Schlafqualität und eine Verkürzung der Schlaflatenz festgestellt. Allerdings war die verbesserte Schlafqualität nur bei Probanden mit Schlafproblemen nachweisbar (Leathwood et al. 1982). Leathwood und Chauffard bestätigten das Ergebnis in einer weiteren Studie an acht Probanden (Leathwood und Chauffard 1985). In beiden Studien wurde mittels Selbstbeurteilungsskala geprüft. Zusätzlich konnte in einer anderen Studie – ebenfalls mittels Fragebogen - eine Verkürzung der Wachzeit festgestellt werden (Balderer und Borbley 1985). Die polysomnographischen Analysen im Schlaflabor (mittels Elektroenzephalogramm), die in zwei Studien erstellt wurden, zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede zur Plazebo-Gruppe (Leathwood und Chauffard 1982, Balderer und Borbley 1985).

Schulz et al. testeten einen wässrig-alkoholischen Extrakt (Valdispert®) an 14 älteren Patienten. Eine Zunahme der Schlafstadien 3 und 4 (des langwelligen Schlafs) konnte mittels polysomnographischen Messungen festgestellt werden (Schulz et al. 1994), allerdings zeigten sich kein signifikanter Unterschied zwischen Verum- und Plazebo-Gruppe.

Ein 70%iger ethanolischer Extrakt (DEV 3-6:1) wurde in mehreren Plazebo-kontrollierten Doppelblind-Studien mit unterschiedlichem Design an Probanden untersucht. Die Dosis lag meist bei 600 mg, die Dauer der Applikation reichte von einer einmaligen Gabe bis zu 6 Wochen. Nach akuter Gabe konnte bei Donath et al. keine Verbesserung schlafspezifischer Parameter beobachtet werden, allerdings zeigte sich bereits nach 14 Tagen eine signifikante Verkürzung der Tiefschlaf-Latenzzeit. Die Schlafeffizienz war in Verum- und Plazebo-Gruppe signifikant verbessert (Donath et al. 2000). Nach 4 Wochen kam es in zwei weiteren Studien zu einer signifikanten Verbesserung der Schlafqualität und der Befindlichkeit sowie des Schweregrades der Insomnie (Vorbach et al. 1996, Dorn 2000). In einer Plazebo-kontrollierten Doppelblind-Analyse wurden 300 mg bzw. 600 mg des 70%igen EtOH-Extraktes während drei Wochen an Patienten mit Schlafstörungen verabreicht. Die EEG-Auswertung und eine Befragung der Patienten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Verum und Placebo (Diaper und Hindmarch 2004).

Dorn sowie Ziegler et al. verglichen einen 70%igen Baldrianextrakt mit Oxazepam, in beiden Studien zeigte sich eine signifikant verbesserte Schlafqualität, wobei zwischen der Baldrian

und der Oxazepam-Gruppe kein Unterschied zu erkennen war (Dorn 2000, Ziegler et al. 2002).

Eine weitere Studie untersuchte die psychischen und physischen Reaktionen auf Stress nach Gabe von 600 mg eines 70%igen Baldrianextraktes (DEV 5:1) über einen Zeitraum von sieben Tagen (Cropley et al. 2002). Es wurde eine signifikante Verringerung der stressbedingten Symptome (Anstieg des Blutdrucks und der Pulsfrequenz) in der Verum-Gruppe beobachtet. In der Plazebo-Gruppe war keine deutliche Veränderung zu erkennen.

An 102 Probanden wurden die Effekte eines 70%igen Baldrianextraktes (DEV 3-6:1) und von Flunitrazepam auf Reaktionszeit, Vigilanz und Konzentration am Morgen nach der Einnahme untersucht. Reaktionszeit, Vigilanz und Koordination blieben unbeeinflusst, die Schlafqualität verbesserte sich allerdings (Kuhlmann et al. 1999). Eine zweite Plazebo-kontrollierte Doppelblind-Studie mit dem gleichen Extrakt bestätigte die Ergebnisse. Eine einmalige Dosis von 600 mg, 1200 mg bzw. 1800 mg beeinträchtigte weder psychomotorische noch kognitive Fähigkeiten der Probanden in der Baldriangruppe, eine signifikante Beeinflussung konnte nur in der Diazepam-Gruppe beobachtet werden (Gutierrez et al. 2004). Hallam et al. fanden ebenfalls keine Beeinflussung der psychomotorischen und kognitiven Fähigkeiten nach einer einmaligen Gabe eines 70%igen Baldrianextraktes (Hallam et al. 2003).

Studien mit Kombinationspräparaten von Baldrianwurzel-Extrakt mit Hopfen- oder Melissen-Extrakt, die eine Wirksamkeit solcher Zubereitungen belegen, stützen die Ergebnisse mit Baldrian-Monopräparaten (Kennedy et al. 2006, Koetter et al. 2007).

So konnte in den meisten Studien mit wässrigen oder wässrig-alkoholischen Extrakten gezeigt werden, dass es durch die Einnahme von Baldrian-Präparaten zu einer Verbesserung schlafspezifischer Parameter kommt. Sowohl eine verkürzte Einschlafzeit als auch eine Verbesserung der Schlafqualität und eine Verbesserung von Ein- und Durchschlafstörungen wurde in unterschiedlichen Studien beobachtet. Hang-over Effekte sowie Beeinflussung von kognitiven Fähigkeiten wurden nicht hervorgerufen. Insgesamt kann die Behandlung von leichten Schlafstörungen mit Präparaten aus *Valeriana radix* durchaus als sinnvoll erachtet werden, da es zu einer Besserung der Beschwerden kommt, die Nebenwirkungen allerdings weitaus geringer sind, als nach der Einnahme synthetischer Schlafmittel.

Aufgrund der Heterogenität und der daher schwer vergleichbaren Ergebnisse (verschiedene polare Baldrianextrakte, unterschiedliches Studiendesign) wird der klinische Nachweis der Wirksamkeit von *Valeriana officinalis* L. s.l. in zwei Meta-Analysen als nicht befriedigend eingestuft, weitere Studien zur Bestätigung dieser zur Behandlung von Schlafstörungen werden gefordert (Stevinson und Ernst 2000, Bent et al. 2006).

1.1.2 Pharmakologische Wirkung (bisherige Forschungsergebnisse)

Da Zubereitungen der Gattung *Valeriana* in der Volksmedizin verschiedener Kulturen schon seit langer Zeit angewendet wurden, stellte sich immer wieder die Frage nach den wirksamen Inhaltsstoffen. Allerdings sind Extrakte unterschiedlicher Polarität und damit auch unterschiedlicher Zusammensetzung aus *Valerianae radix* in Verwendung. In polaren (wässrigen) Extrakten findet sich ein anderes Spektrum der Inhaltsstoffe als in mittel- oder apolaren Extrakten. Durch diese Heterogenität ist es schwierig, Untersuchungen oder Studien miteinander zu vergleichen und ein einheitliches Ergebnis daraus zu erhalten.

Verschiedene Extrakte wurden in Tier- und an Rezeptormodellen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit bzw. Wirkung getestet. An der Maus konnte mit einem wässrig-alkoholischen Extrakt eine zentral dämpfende Aktivität beobachtet werden (Leuschner et al. 1993). Ein ethanolischer Extrakt zeigte zwar antikonvulsive Eigenschaften an der Maus, eindeutig sedierende Effekte konnten allerdings nicht beobachtet werden (Hiller und Zetler 1996).

Neben Untersuchungen an verschiedenen Rezeptoren, die an sedativen oder anxiolytischen Wirkmechanismen beteiligt sind, stand immer wieder ein Angriff von Extrakten oder einzelnen Inhaltsstoffen am GABA_A-Rezeptor-Komplex im Vordergrund.

Wässrige Baldrianextrakte erhöhten *in vitro* die GABA-Ausschüttung aus Synaptosomen und hemmten die Wiederaufnahme, was zu einer erhöhten GABA-Konzentration im synaptischen Spalt führte (Santos et al. 1994a, Santos et al. 1994b, Santos et al. 1994c).

Cavadas et al. zeigten in einer *in vitro* Studie die Verdrängung von am Rezeptor gebundenem [³H]Muscimol an Synapsenmembranen von Mäusen durch einen wässrigen sowie durch einen wässrig-alkoholischen Extrakt. Allerdings enthielten beide Extrakte GABA, wodurch sich das Ergebnis erklären ließe, da die Aminosäure selbst einen 99%igen Verdrängungseffekt bewirkte (Cavadas et al. 1995). *In vivo* können die sedativen Eigenschaften dieser Extrakte durch den Gehalt an GABA allerdings nicht erklärt werden, da GABA, wenn exogen zugeführt, nicht ins ZNS gelangt (Hespe et al. 1969).

Eine andere *in vitro* Bindungsstudie zeigte eine Interaktion von alkoholischen Baldrianextrakten mit der Bindung von [³H]Flunitrazepam. In niedrigen Konzentrationen wurde die Bindung verstärkt, durch Erhöhung der Konzentration kam es jedoch zu einer Inhibition. Die Autoren vermuten daher zumindest zwei unterschiedliche Wirkkomponenten (Ortiz et al. 1999).

Das inhibitorische postsynaptische Potential im isolierten Rattengehirn wurde durch einen methanolischen Extrakt und einen Ethylacetat-Extrakt aus *Valeriana officinalis* L. s.l. beeinflusst. Durch Zugabe von Antagonisten konnte eine Interaktion des Ethylacetat-Extraktes mit dem GABA_A-Rezeptor beobachtet werden, da die Wirkung durch Picrotoxin

abgeschwächt wurde. Der methanolische Extrakt griff im Gegensatz dazu am A₁-Adenosin Rezeptor an (Sichardt et al. 2007).

Immer wieder wurde versucht, die Wirkung von *Valeriana officinalis* L. s.l. einem Inhaltsstoff oder einer Substanzgruppe zuzuschreiben. Daher waren oft Reinsubstanzen oder angereicherte Fraktionen Gegenstand der Untersuchungen.

Zu Beginn stand das ätherische Öl im Mittelpunkt des Interesses. Für einige isolierte Komponenten, wie Valerenal, Valeranon und Isoeugenylisovaleriansäure konnte eine sedierende und spasmolytische Wirkung nachgewiesen werden (Hendriks et al. 1981). Bald wurden jedoch Epoxy-Triester (Esteriridoide), so genannte Valepotriate isoliert (Thies und Funke 1966), die im Tierversuch sedierend und spasmolytisch wirkten (Eickstedt und Rahman 1969, Wagner und Jurcic 1979). Weitere Untersuchungen stellten diese ersten Ergebnisse allerdings in Frage (Grusla et al. 1986).

Bei Bindungsstudien wurde Isovaltrat als inverser Agonist am Adenosin A₁-Rezeptor identifiziert (Lacher et al. 2007).

Bei den Valepotriaten handelt es sich, aufgrund ihrer zyklischen Acetalstruktur, um eine chemisch labile Substanzklasse, die durch Wärme und Feuchtigkeit sowie saure oder basische Einflüsse rasch zu Abbauprodukten wie Baldrinal und Homobaldrinal umgewandelt wird (Bos et al. 1996). Für beide Substanzgruppen – sowohl für die Valepotriate als auch für die Baldrinale - wurden zytotoxische und mutagene Eigenschaften nachgewiesen (Bos et al. 1998, Bounthanh et al. 1983, Braun et al. 1982, Schneider und Willems 1982). Das Potential war bei ihren Abbauprodukten allerdings weitaus geringer als bei den Valepotriaten selbst.

Valepotriate werden im Gastrointestinal-Trakt rasch zu Baldrinalen umgewandelt, die wiederum einem hohen first-pass Effekt unterliegen.

Da die Konzentration dieser Verbindungen in handelsüblichen Extrakten aus *Valeriana officinalis* L. s.l. gering ist und nach Einnahme dieser ein rascher Abbau erfolgt, wird nicht angenommen, dass bei empfohlener Dosierung toxische Dosen erreicht werden (Braun et al. 1982).

Der fehlende Wirkungsnachweis und die Instabilität der Valepotriate lassen darauf schließen, dass es andere Inhaltsstoffe geben muss, die für die beschriebene sedierende Wirkung des Baldrians verantwortlich sind.

Nach der Isolierung einiger Lignane ergaben pharmakologische Untersuchungen eine Affinität des 8-Hydroxypinoresinols zum 5-HT_{1A}-Rezeptor (Bodesheim und Hölzl 1997). Dieser Rezeptor-Subtyp hat Einfluss auf den Schlaf-Wach-Rhythmus und ist Angriffspunkt einiger Psychopharmaka. Ein neu isoliertes Olivilderivat (4'-O-β-D-Glucosyl-9-O-(6''-desoxysaccharosyl)olivil) zeigte eine partielle agonistische Aktivität zum A₁-Adenosin-

Rezeptor. Es kann den Antagonisten Koffein kompetitiv verdrängen, allerdings war die intrinsische Aktivität geringer als bei vollen Agonisten (Schumacher et al. 2002). Bei diesem Olivil-Derivat handelt es sich um ein Glukosid und somit um eine hydrophile Verbindung, daher sollten Resorption, Metabolismus und „Blut-Hirn-Schranken-Permeation“ dieses Lignans näher untersucht werden, um einen Beitrag zur Wirkung des Baldrians zu bestätigen.

Auch Flavonoide wurden aus der Baldrianwurzel isoliert und werden als Wirksubstanzen diskutiert. Neben Linarin wurden 6-Methylapigenin und Hesperidin identifiziert (Fernandez et al. 2003, Marder et al. 2003). Rezeptorbindungsstudien zeigten eine Affinität von 6-Methylapigenin zum GABA_A-Rezeptor (Wasowski et al. 2002), außerdem wurden anxiolytische Effekte an Mäusen beobachtet. Für Hesperidin konnten sedative und Schlaf-induzierende Effekte im Tierversuch nachgewiesen werden. Weiters wird ein Synergismus der beiden Substanzen vermutet (Marder et al. 2003). Auch Linarin zeigte eine sedierende und Schlaf-induzierende Wirkung an Mäusen, die durch 6-Methylapigenin und Valerensäure noch verstärkt wurden (Fernandez et al. 2004).

Im Europäischen Arzneibuch werden die Sesquiterpensäuren, Valerensäure und Acetoxyvalerensäure, zur Standardisierung von *Valeriana officinalis* L. s.l. herangezogen, da diese Komponenten in anderen Baldrian-Arten fehlen. 1957 konnten die beiden Säuren erstmals aus *Valerianae radix* isoliert werden (Stoll und Seebeck 1957). Eine Reihe von Untersuchungen belegt die Wirksamkeit der Valerensäure: Hendriks et al. fanden eine sedierende und muskelrelaxierende Wirkung sowie eine zentral dämpfende Wirkung an Mäusen (Hendriks et al. 1981, Hendriks et al. 1985). In einem anderen Versuch an der Maus wurde ein Antagonismus zu Picrotoxin, einem GABA_A-Rezeptor-Antagonisten, gefunden (Hiller und Zetler 1996). In Rezeptorbindungsstudien wurde eine agonistische Aktivität am 5-HT_{5a}-Rezeptor beobachtet und durch Bioassay-guided Fraktionierung Valerensäure als die aktive Substanz mit signifikanter Affinität zu diesem Rezeptorsubtyp identifiziert. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um einen Serotonin-Rezeptor, der involviert ist in die Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus (Dietz et al. 2005).

Hydroxyvalerensäure und Acetoxyvalerensäure sollen den Abbau von GABA hemmen und damit die Konzentration des Neurotransmitters im synaptischen Spalt erhöhen (Riedel et al. 1982).

Durch Valerensäure wurde die Aktivität von Hirnstamm-Neuronen gehemmt, ein Effekt, der auch durch den GABA_A-Rezeptor Agonisten Muscimol in diesen Neuronen erzielt wurde. Dieser Effekt konnte durch den GABA_A-Antagonisten Bicucullin gehemmt werden (Yuan et al. 2004).

Trotz vieler Einzelergebnisse konnte bisher allerdings die nachgewiesene sedierende Wirkung von Gesamtextrakten der Baldrianwurzel weder einer einzelnen Inhaltsstoffgruppe zugeordnet werden, noch Wirkmechanismen identifiziert werden.

1.2 Zielsetzung

Durch die Fülle und Heterogenität der bisher bekannten Forschungsergebnisse bezüglich der Wirkung und Wirksamkeit der Arzneidroge *Valerianae radix* wird verdeutlicht, dass es schwierig ist, dafür verantwortliche Inhaltsstoffe und Wirkmechanismen zu definieren. Ziel der Arbeit war es, einen weiteren Beitrag zu den bisherigen Untersuchungen dieses Viel-Komponenten-Gemischs zu leisten und mögliche Inhaltsstoffe zu identifizieren, die für die Wirksamkeit mitverantwortlich sind.

Einer der Hauptangriffspunkte für sedierend wirkende Substanzen ist der GABA_A-Rezeptor-Komplex. Durch Rezeptorbindungsstudien gab es Hinweise auf eine Interaktion zwischen Inhaltsstoffen aus dem Baldrian und diesem Rezeptor (Hiller und Zetler 1996, Mennini et al. 1993, Ortiz et al. 1999, Santos et al. 1994a, Santos et al. 1994b, Santos et al. 1994c, Sichardt et al. 2007, Wasowski et al. 2002, Yuan et al. 2004).

In dieser Arbeit sollte eine Wirkung von Baldrian-Extrakten am GABA_A-Rezeptor untersucht werden. Dafür stand ein *in vitro* Modell an isolierten *Xenopus laevis* Oozyten zur Verfügung an welchem eine Modulation und damit eine Bindung am Rezeptor gemessen werden konnte. Durch Extraktion und Fraktionierung mit unterschiedlich polaren Lösungsmitteln sollten Bioassay-guided Inhaltsstoffe isoliert und identifiziert werden, die für die Interaktion mit dem GABA_A-Rezeptor verantwortlich sind. Auch eine mögliche Bindungsstelle sollte charakterisiert und Dosis-Wirkungs-Beziehungen untersucht werden.

Über die Permeation von Baldrian-Extrakten oder daraus isolierten Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke ist wenig bekannt. Da die Penetration durch diese Barriere essentiell ist für Substanzen, die im Zentralnervensystem ihre Wirkung entfalten, sollten die am GABA_A-Rezeptor-Modell aktiven Substanzen auch hinsichtlich ihrer „ZNS-Gängigkeit“ untersucht werden. Dafür stand ein *in vitro* Modell, basierend auf *ECV304*-Zellen, zur Verfügung um Permeabilitätsdaten zu bestimmen.

Die Biotransformation von isolierten, *in vitro* getesteten Komponenten ist ein wichtiger Baustein in der Untersuchung des pharmakologischen Profils einer Substanz. Da Baldrianzubereitungen ausschließlich peroral appliziert werden, unterliegen die enthaltenen Verbindungen einem Metabolismus. Mittels etabliertem *in vitro* Modell an der isolierten, perfundierten Rattenleber sollte dieser in einem möglichst physiologischen Umfeld untersucht werden.

Als Ergänzung zu all diesen Untersuchungen wurde auch eine Bestätigung der *in vitro* gemessenen pharmakologischen Wirkung durch *in vivo* Untersuchungen als notwendig

erachtet. Im Tierversuch sollte mittels Elevated Plus Maze-Test die Wirksamkeit von Baldrian-Inhaltsstoffen bestätigt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war also, einen oder mehrere Inhaltsstoffe aus *Valerianae radix* durch Isolierung zu identifizieren, der über einen möglichen Wirkmechanismus – die Modulation am GABA_A-Rezeptor - mitverantwortlich ist für die Wirksamkeit dieser Arzneidroge und so einen weiteren Beitrag zum Wissensstand und Verständnis der Wirkung der Arzneipflanze *Valeriana officinalis* L. s.l. zu leisten.

2 MATERIAL und METHODEN

2.1 Material

Pflanzenmaterial

Valerianae radix

Die Droge, bestehend aus den getrockneten, unterirdischen Teilen von *Valeriana officinalis* L. s.l., stammte von Firma Richter, Kufstein, Österreich

Kontrollnummer: KL-407 937/03, Charge: P58937

Reagenzien und Chemikalien

- Chemikalien für die Chromatographie und Extraktion
 - Acetonitril p.a. (Firma J.T. Baker, Deventer, Holland)
 - Methanol p.a. (Firma J.T. Baker, Deventer, Holland)
 - Chloroform technisch (Firma J.T. Baker, Deventer, Holland), vor Gebrauch destilliert
 - Dichlormethan p.a. (Firma J.T. Baker, Deventer, Holland)
 - Ethylacetat (Firma J.T. Baker, Deventer, Holland)
 - n-Butanol (Firma J.T. Baker, Deventer, Holland)
 - Aceton technisch (Firma J.T. Baker, Deventer, Holland), vor Gebrauch destilliert
 - Ammoniak konz. (24 – 26 %) (Firma Gatt-Koller, Absam, Österreich)
 - Phosphorsäure konz. (85 %) (Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - Essigsäure konz. (99 %) (Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - Salzsäure konz. (36 %) (Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Für die HPLC-Analysen wurden Lösungsmittel mit p.a. Qualität verwendet.

- Chemikalien und Reinsubstanzen
 - Dantron (Firma Fluka, Seelze, Deutschland)
 - Valerensäure (Firma PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland)
 - Acetoxyvalerensäure (Firma PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland)
 - Hydroxyvalerensäure (Firma PhytoLab, Vestenbergsgreuth, Deutschland)
 - Diazepam (AGES, PharmMed, Wien, Österreich)

- GABA (Firma Sigma-Aldrich, Wien, Österreich)
- Anisaldehyd (Firma Fluka, Seelze, Deutschland)
- Ninhydrin (Firma Fluka, Seelze, Deutschland)

Extrakte und Bezeichnung

Eigen hergestellte Extrakte	Bezeichnung
Petrolether-Extrakt	PE
Ethylacetat-Extrakt ⁺	EtOAc
MeOH-Extrakt ⁺	MeOH
H ₂ O-Extrakt ⁺	H ₂ O
Ethylacetat	EA
Tinktur	Tct
Infus	Inf
Kommerzielle Extrakte¹	
Extractum Valerianae spir. siccum	1
Extractum Valerianae spir. spissum	2
Extractum Valerianae aqu. spissum	3
Extractum siccum (60 % EtOH)	4
Extractum siccum (70 % EtOH)	5
Extractum siccum (45 % MeOH)	6
Extractum siccum (EtOAc)*	7
Extractum siccum (EtOAc)	8
Extractum siccum (6 + 8) ^x	9
Spissum UB 2004-14 (H ₂ O)	F1
Spissum UB 2004-18 (35 % EtOH)	F2
TE UB 2004-18 (35 % EtOH spezial)	F3
Extr. Val. 45 % EtOH	F4
TE UB 2005-134 (70 % EtOH)	F5

⁺ fortlaufende Extraktion

* Extraktion des Rückstands von Extrakt 6

^x Mischung von Extrakt 6 und Extrakt 8

Tabelle 2: Bezeichnung und Charakterisierung der untersuchten Extrakte

¹ Die Firmenherkünfte der kommerziellen Extrakte sind bekannt, werden aber nicht angeführt, da es sich nicht um Auftragsarbeiten handelte. Eine nähere Charakterisierung der Extrakte bezüglich Extraktionsverfahren (und –mittel) ist nicht bekannt.

2.2 Extraktion

2.2.1 Extraktion zur Herstellung unterschiedlich polarer Extrakte

Für die Extraktion wurden 10 g Droge pulverisiert (Siebgröße IV, ÖAB) und mit 100 ml Petrolether (PE) 30 Minuten am Ultraschallbad bei 20 °C extrahiert und anschließend filtriert. Der Drogenrückstand wurde getrocknet und in gleicher Weise fortlaufend mit Ethylacetat (EtOAc), Methanol (MeOH) und Aqua dest. (H₂O) extrahiert. Die Filtrate wurden am Rotavapor zur Trockene gebracht. Es resultierten 105,26 mg PE-Extrakt (DEV 95:1), 71,94 mg EtOAc-Extrakt (DEV 139:1), 1,483 g MeOH-Extrakt (DEV 7:1) und 1,675 g H₂O-Extrakt (DEV 6:1).

Weiters wurden Zubereitungen der traditionellen Anwendung - Tinktur und Infus – hergestellt. Um eine Tinktur zu erhalten, wurden 10 g pulverisierte Droge (Siebgröße IV, ÖAB) mit 70%igem EtOH 30 Minuten unter Rückfluss am Wasserbad extrahiert und anschließend filtriert. Das Infus wurde durch Übergießen der pulverisierten Droge mit 100 ml kochendem Aqua dest. hergestellt.

2.2.2 Extraktion für die Isolierung von Reinsubstanzen

Für die Isolierung von Valerensäure und Hydroxyvalerensäure wurden 500 g pulverisierte Droge mit 5000 ml Ethylacetat 1 Stunde am Wasserbad unter Rückflusskühlung extrahiert und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde am Rotavapor unter vermindertem Druck bei 40 °C zur Trockene gebracht. Es resultierten 7,496 g EA-Extrakt (DEV 67:1).

2.2.2.1 Flüssig/Flüssig-Verteilung

7 g des EA-Extraktes wurden in 140 ml MeOH suspendiert, mit 2M Kaliumhydroxidlösung (100 g/l) versetzt und anschließend mit 350 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Sesquiterpensäuren, die durch Zusatz der Lauge als Salze vorlagen, waren in der wässrig-methanolischen Phase gelöst. Die Dichlormethan-Phase wurde abgetrennt und als Fraktion EA I bezeichnet. Die wässrig-methanolische Phase wurde mit 2M Salzsäure versetzt und noch einmal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Säuren gingen dadurch in die organische Phase über und waren nun in der Dichlormethan-Fraktion (EA II) enthalten. Die Fraktionen wurden unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht und chromatographisch kontrolliert. Es konnte eine Abtrennung von organischen, neutralen Begleitstoffen erzielt werden. 1,45 g Fraktion EA II, angereichert mit Sesquiterpensäuren, wurde erhalten. Abbildung 12 (Seite 23) veranschaulicht die Arbeitsschritte der Flüssig/Flüssig-Extraktion.

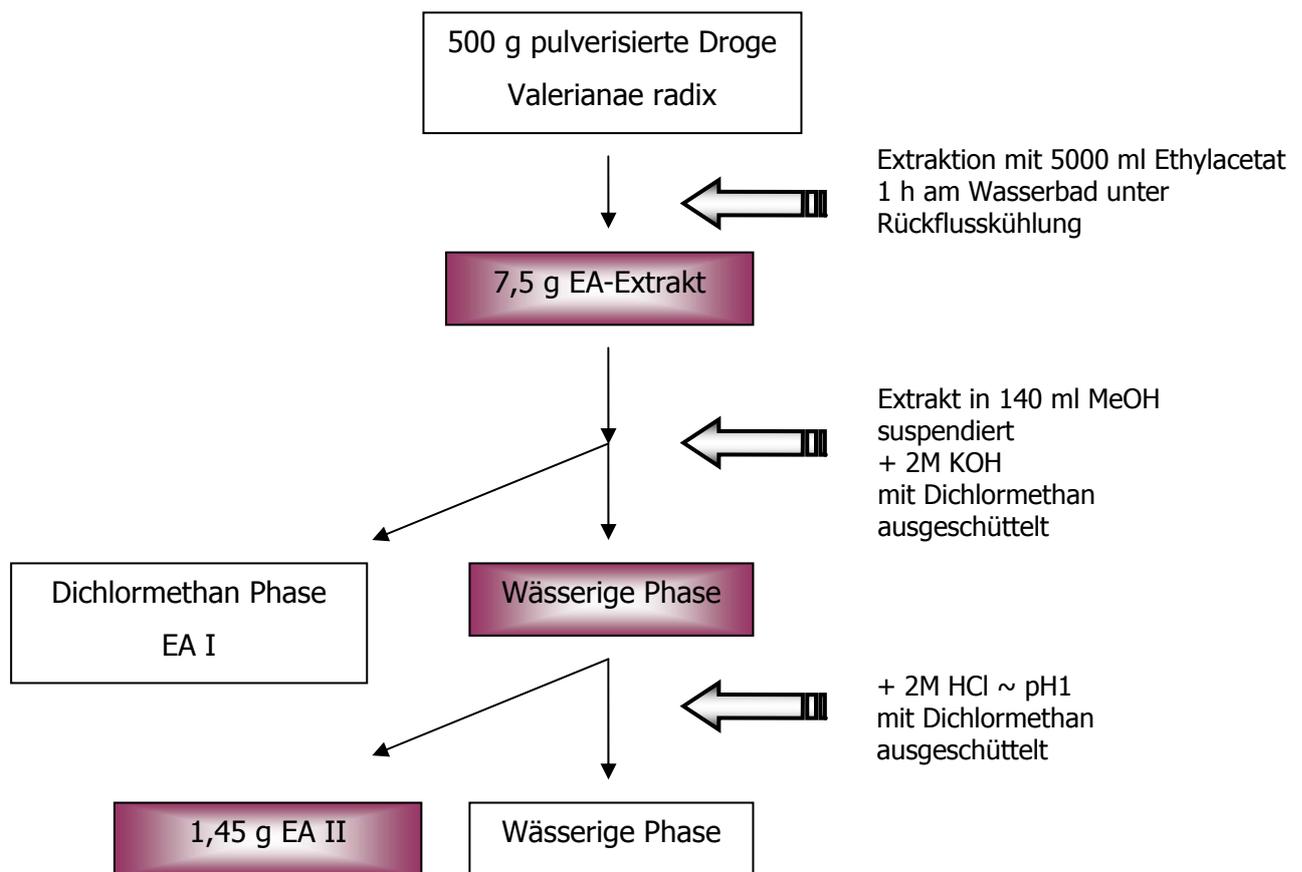


Abbildung 12: Schema der Flüssig/Flüssig-Verteilung zur Anreicherung der Sesquiterpensäuren

2.2.2.2 Anreicherung der Sesquiterpensäuren mittels Festphasenextraktion (SPE)

Für eine weitere Anreicherung der Sesquiterpensäuren und zur Abtrennung von anorganischen, ionischen Begleitsubstanzen wurden Bond Elut LCR NH₂ Kartuschen 500 mg/50 ml der Firma Varian verwendet.

Vor Aufbringen der Probe musste die Kartusche konditioniert werden. Dies erfolgte mit 2 Reservoirvolumina (RV) Aqua dest. und danach 2 RV MeOH; auf die so vorbereitete Kartusche wurde die Probenlösung aufgebracht. Es wurden jeweils zweimal 500 mg und einmal 400 mg Fraktion EA II in 4,0 ml MeOH gelöst und über die Kartusche filtriert. Anschließend wurde zuerst mit 3 RV MeOH und danach mit 3 RV MeOH/HCl_{konz} (pH 1) eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug etwa 1 ml/min. Die Fraktionen wurden separat gesammelt und am Rotavapor unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht und die Anreicherung mittels DC überprüft. Das Gewicht der MeOH/HCl Fraktion (EA II SF) betrug 601,52 mg.

2.3 Chromatographie

2.3.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie diente einerseits als einfache und rasche Trenntechnik, um die Sesquiterpensäuren qualitativ zu erfassen bzw. zur Kontrolle der Fraktionen während der Isolierung. Andererseits wurde mittels DC eine semiquantitative Bestimmung von GABA in den Extrakten durchgeführt und die Abtrennung von GABA aus denselben kontrolliert.

DC-System für Sesquiterpensäuren

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland)

Schichtdicke 0,25 mm

Mobile Phase: Chloroform – Methanol – Aqua dest. Systeme:

95:1,50:0,10

90:3,50:0,20

85:8:0,50

80:10:1,00

75:15:2,00

70:22:3,50

Detektion:

Nach dem Entwickeln und Trocknen der Platte wurde diese mit Anisaldehyd/H₂SO₄-Reagens (Wagner und Blatt 1996) besprüht und anschließend bei 100 °C 5 Minuten getrocknet. Die Auswertung erfolgte im sichtbaren Licht.

DC-System für Aminosäuren

Stationäre Phase: Kieselgel 60 F₂₅₄ Fertigplatten (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland)

Schichtdicke 0,25 mm

Mobile Phase: n-Butanol – Aceton – Eisessig – Aqua dest. (35:35:10:20)

(Wagner und Blatt 1996)

Detektion:

Nach dem Entwickeln und Trocknen der Platte wurde diese mit Ninhydrin-Reagens (Wagner und Blatt 1996) besprüht und anschließend bei 100 °C 5 Minuten getrocknet. Die Auswertung erfolgte im sichtbaren Licht.

2.3.1.1 Semiquantitative Bestimmung von GABA in den Extrakten

Um abschätzen zu können wieviel GABA in den Extrakten enthalten war, wurde nach dünnschichtchromatographischer Detektion der Aminosäure die ungefähre Konzentration berechnet:

Dafür wurden aus den einzelnen Extrakten sowie von GABA jeweils drei Lösungen verschiedener Konzentration hergestellt:

Konzentration der GABA-Lösungen: 0,2 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,025 mg/ml in MeOH

Konzentration der Extrakt-Lösungen: 20 mg/ml; 10 mg/ml; 5 mg/ml in MeOH

Auf einer DC-Platte wurden die drei verschieden konzentrierten Lösungen von GABA und die drei verschieden konzentrierten Lösungen des jeweiligen Extraktes nebeneinander aufgetragen (Auftragsmenge 5 µl). Nach erfolgter Detektion wurde visuell abgeschätzt, wie viel GABA in den Extrakten enthalten war: Die Banden von GABA erschienen - je nach im Extrakt enthaltener Konzentration - unterschiedlich intensiv rosa gefärbt. Die Intensität der einzelnen GABA-Zonen der Extrakte und derer der Reinsubstanz wurden miteinander verglichen. Zur Auswertung wurden die Konzentrationen der zwei Zonen herangezogen, die annähernd gleiche Intensität zeigten. So konnte der ungefähre prozentuelle Gehalt an GABA im Extrakt berechnet werden. Zusätzlich wurde die Konzentration der Aminosäure in der Messlösung des Extraktes (in µM) für die Messung am GABA_A-Rezeptor (siehe Kapitel 2.5.1, Seite 31) errechnet.

2.3.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die analytische HPLC wurde eingesetzt, um die Sesquiterpensäuren in den Extrakten und Proben quantitativ zu erfassen.

Bei der Isolierung der Hydroxyvalerensäure wurde die angereicherte Fraktion im letzten Schritt mittels HPLC aufgereinigt.

Folgendes Gerät wurde verwendet:

Controller	Shimadzu SCL-10AD VP Septum Controller
Degasser	Shimadzu DGU-14A Degasser
Autosampler	Shimadzu SIL-10AD VP Auto Injector
Pumpe	Shimadzu SPD 10 AD VP Liquid Chromatograph
Detektor	Shimadzu SPD M10AD VP Diode Array Detektor
Software	LCSolution

Tabelle 3: HPLC/UV-Parameter für die Analyse der Sesquiterpensäuren

Mittels Dioden-Array-Detektor wurden die UV-Spektren zur Bestätigung der Identität der Sesquiterpensäuren gemessen.

Trennsysteme:

Stationäre Phase

	Vorsäule	Säule
Gehaltsbestimmung Extrakte; Isolierung	HP Hypersil ODS C18, 5 µm, 4 x 250 mm	Machery-Nagel Nucleosil C18, 5 µm, 4 x 250 mm
„Permeabilitätsstudien“	HP LiChrospher C18, 5 µm, 4 x 250 mm	Merck LiChrospher C18, 5 µm, 4 x 250 mm

Tabelle 4: HPLC-Parameter für die Analyse der Sesquiterpensäuren

Mobile Phase

Für die Gehaltsbestimmung der Sesquiterpensäuren in den Extrakten und in den Probelösungen der „Permeabilitätsstudien“ wurden folgende Fließmittel verwendet:

Fließmittel A: Aqua dest. (mit H₃PO₄ auf pH 3,0 eingestellt)

Fließmittel B: Acetonitril

Fluss: 1,5 ml/min

Detektion: 220 nm

Für die Isolierung der Hydroxyvalerensäure (HVS) wurden folgende Fließmittel verwendet:

Fließmittel A: Aqua dest.

Fließmittel B: Methanol

Fluss: 1,5 ml/min

Detektion: 220 nm

Gradient:

Gehaltsbestimmung					
Extrakte / Fraktionen		„Permeabilitätsstudien“		Isolierung	
Zeit (min)	% B	Zeit (min)	% B	Zeit (min)	% B
5	47	5	40	5	40
18	68	7	45	20	100
19	100	8	52	30	100
30	100	18	68	31	40
31	47	21	77	40	40
40	47	22	100		
		30	100		
		31	40		
		40	40		

Tabelle 5: Methoden der HPLC-Analysen der Sesquiterpensäuren zur Gehaltsbestimmung in den Extrakten, Fraktionen und Probelösungen der „Permeabilitätsstudien“ sowie HPLC-Bedingungen zur Isolierung der Hydroxyvalerensäure

Probenvorbereitung

Die Extrakte wurden nach einer modifizierten Methode der Monographie des EuAB quantifiziert. Dafür wurden 10 mg der Extrakte und Fraktionen unterschiedlicher Polarität in 1,00 ml Methanol gelöst, eventuell vorhandene Schweb- und Begleitstoffe abzentrifugiert und mit 1,00 ml interner Standardlösung (30 mg Dantron in 100,00 ml MeOH) versetzt.

20 µl der zentrifugierten Lösung wurden injiziert. Alle Proben wurden in Dreifachbestimmungen analysiert.

Der Gehalt an Valerensäure bzw. Acetoxyvalerensäure wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\%_{\text{VS bzw. AVS}} = \frac{A_2 \times M_1 \times F}{A_1 \times M_2}$$

A₁ Peakfläche von Dantron (ISTD)

A₂ Peakfläche der Substanz

M₁ Einwaage des Dantrons (g)

M₂ Einwaage des Extrakts in 50 ml (g)

F 8,09 (Valerensäure) bzw. 11,51 (Acetoxyvalerensäure)

Für die Quantifizierung der Sesquiterpensäuren nach den „Permeabilitätsstudien“ wurden 500 µl der Probe (siehe Kapitel 2.6, Seite 35) mit 1,00 ml Acetonitril versetzt und für 30 Minuten bei 4 °C gelagert, um Serumproteine und Begleitstoffe auszufällen. 40 µl des nach Zentrifugation erhaltenen Überstands wurden in Dreifachbestimmungen analysiert.

Für die Isolierung wurden 34 mg der angereicherten Fraktion F9 (siehe Seite 62) in 3,00 ml MeOH gelöst und anschließend zentrifugiert, um eventuelle Schwebstoffe abzutrennen. Jeweils 40 µl wurden injiziert.

2.3.3 Vacuum Liquid Chromatography (VLC)

Die VLC wurde angewendet, um den Ethylacetat-Extrakt (EA) grob zu fraktionieren und eine Auftrennung der Inhaltsstoffe nach Polarität zu erreichen. Es handelt sich bei dieser Methode um eine Säulenchromatographie, bei der am Säulenauslass über eine Saugflasche verminderter Druck angelegt wird, um die Elutionszeit zu verkürzen.

Säule:

Länge:	40 cm
Füllhöhe:	30 cm
Durchmesser:	2 cm
Elutionsvolumen:	je 100 ml

Stationäre Phase:

Kieselgel 60; 0,063 – 0,200 mm Korngröße (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland)

Mobile Phasen:

Fraktionen 1 – 4:	CH ₂ Cl ₂
Fraktion 5:	CH ₂ Cl ₂ + MeOH (90:10)
Fraktion 6:	CH ₂ Cl ₂ + MeOH (80:20)
Fraktion 7:	CH ₂ Cl ₂ + MeOH (70:30)
Fraktion 8:	CH ₂ Cl ₂ + MeOH (60:40)
Fraktion 9:	CH ₂ Cl ₂ + MeOH (50:50)
Fraktion 10:	CH ₂ Cl ₂ + MeOH + H ₂ O (50:40:10)

Die Säulen wurden mit 40 g Kieselgel trocken gepackt. Um eine möglichst hohe Dichte zu erzielen, wurde während des Füllens wiederholt verminderter Druck an die Säule angelegt.

5 g EA-Extrakt (siehe Kapitel 2.2.2, Seite 22) wurden in CH_2Cl_2 gelöst, im Verhältnis 1:4 auf Kieselgel aufgezogen und nach Verdunsten des Lösungsmittels auf die befüllte Säule aufgebracht. Danach wurde mit der Elution begonnen: Jeweils 100 ml mobile Phase wurden mittels Unterdruck eluiert und am Säulenauslass separat gesammelt. Zwischen den Fraktionen wurde das Elutionsmittel durch Anlegen verminderten Drucks aus der Säule entfernt. Die Fraktionen wurden am Rotavapor bei 40 °C unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht und chromatographisch analysiert.

2.3.4 Säulenchromatographie (SC)

2.3.4.1 Säulenchromatographie an Kieselgel

Die Auftrennung der drei Sesquiterpensäuren aus der angereicherten Fraktion, die mittels SPE erhalten wurde (siehe Kapitel 2.2.2.2, Seite 23), erfolgte mittels Säulenchromatographie.

Säule:

Länge:	100 cm
Füllhöhe:	90 cm
Durchmesser:	2,5 cm
Elutionsgeschwindigkeit:	3 ml/20 min

Stationäre Phase:

Kieselgel 60; 0,063 – 0,200 mm Korngröße (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland)

Mobile Phasen:

CHCl_3 – MeOH – H_2O (95:1,5:0,2):	500 ml
CHCl_3 – MeOH – H_2O (80:10:1):	1100 ml
CHCl_3 – MeOH – H_2O (75:15:2):	500 ml
CHCl_3 – MeOH – H_2O (70:22:3,5):	500 ml

Vor Befüllen der Säule mit Kieselgel wurde dieses in der mobilen Phase suspendiert. 601,5 mg der sauren MeOH Fraktion (EA II SF, gewonnen durch SPE, siehe Kapitel 2.2.2.2, Seite 23) wurden in 4 ml MeOH gelöst und langsam auf 850 mg Kieselgel aufgetropft. Nach Verdampfen des Lösungsmittels konnte die getrocknete Probe langsam auf die mit Kieselgel befüllte Säule aufgetragen werden. Danach wurde mit der Elution begonnen. Die Fraktionen wurden mittels Fraktionssammler gesammelt. Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung jeder fünften Fraktion, konnten Einzelfraktionen mit ähnlichem Muster vereinigt werden, wodurch elf Sammelfraktionen resultierten.

2.3.4.2 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie diente zur Abtrennung von Aminosäuren, vor allem GABA, aus den Baldrian-Extrakten. Dies erfolgte mittels Kationenaustauscher DOWEX 50WX8-200 (Firma Sigma Aldrich, Wien, Österreich).

Säule:

Länge:	5 cm
Füllhöhe:	3 cm
Durchmesser:	1 cm
Elutionsgeschwindigkeit:	1 ml/min
Reservoirvolumen:	2 ml

Vorreinigung des Ionenaustauschers

Das Harz wurde 30 Minuten in 50%igem EtOH bei 60 °C am Wasserbad zur Quellung gebracht, danach wurde der EtOH vorsichtig abgegossen und das Harz anschließend mit Aqua dest. gewaschen. Nun wurde das Harz nochmals 30 Minuten in 2M HCl bei 50 °C vorgereinigt und wieder mit Aqua dest. gewaschen.

Die Harzsuspension wurde in ein Glasröhrchen gefüllt, das am Auslass mit einem Filterpapier bedeckt war. Die Vorkonditionierung erfolgte mit 3 Reservoirvolumina (RV) Aqua dest., danach konnte die gelöste Probe aufgebracht werden: Es wurden jeweils 10 mg Extrakt in 1,00 ml EtOH gelöst, mit 1,00 ml Aqua dest. verdünnt und über die Kartusche filtriert. Anschließend folgte die Elution mit 5 RV H₂O, um den Extrakt zu erhalten (= Fraktion A). Danach wurde mit 5 RV 6M NH₃ eluiert, um die Aminosäuren abzulösen (= Fraktion B). Die Elutionsgeschwindigkeit betrug etwa 1 ml/min. Die beiden Fraktionen wurden separat gesammelt und am Rotavapor unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht. Anschließend wurde die Abtrennung mittels Dünnschichtchromatographie (siehe Seite 25) kontrolliert.

2.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Struktur und damit die Identität der isolierten Sesquiterpensäuren (Valerensäure und Hydroxyvalerensäure) wurden mittels ¹H- und ¹³C-NMR bestätigt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 600 MHz Gerät (Bruker Advance). Die Proben wurden in deuteriertem Chloroform bei einer Messtemperatur von 298,1 °K vermessen.

2.5 Pharmakologische Testung

2.5.1 Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik an *Xenopus laevis* Oozyten

Um eine mögliche Modulation durch Baldrian-Extrakte oder Reinsubstanzen am GABA_A-Rezeptor feststellen zu können, wurden in Kooperation mit dem Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien Messungen an isolierten *Xenopus laevis* Oozyten mittels Zwei-Mikroelektroden Spannungsklemmtechnik durchgeführt. Dabei handelt es sich um die Eizellen des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*, die ein Standardobjekt für die Untersuchung und Expression von Ionenkanälen und Membranrezeptoren darstellen. GABA_A-Kanäle werden durch Injektion spezifischer RNA heterolog an der Membranoberfläche der Oozyten exprimiert (siehe unten). Die Zwei-Mikroelektroden Spannungsklemmtechnik ermöglicht die Messung transmembranärer Ionenströme bei konstant gehaltenem Membranpotential. Dadurch kann eine agonistische oder antagonistische Bindung von Substanzen an den GABA_A-Rezeptor untersucht werden.

2.5.1.1 Oozytenpräparation

Die Oozyten wurden aus den weiblichen narkotisierten Fröschen operativ isoliert. Nach Überführung der Oozyten in eine mit OR2-Lösung (82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,5 (NaOH)) befüllte Petrischale folgte eine Reinigung der Eizellen von Follikelgewebe und Bindegewebe. Das geschah durch 90 minütige Inkubation in Calciumfreier OR2-Lösung nach Zusatz von Kollagenase (2 mg/ml) bei 20 °C. Danach wurden die Oozyten gründlich gewaschen und in ND96-Lösung (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂* 6 H₂O, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4) transferiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von zwölf Stunden wurden jene Oozyten ausgewählt, die sich am besten für die Injektion eigneten (Durchmesser 1000 – 1200 µm).

2.5.1.2 Injektion von cRNA

Durch Auswahl der cRNA besteht die Möglichkeit, die Untereinheiten, die die Pore des GABA_A-Kanals bilden (siehe auch Abbildung 19, Seite 43), zu variieren. Die cRNA wird in den Oozyten injiziert und codiert für die heterologe Expression der Rezeptoren an der Oozytenmembran. Vor der Injektion wurden die einzelnen cRNA im Verhältnis 1:1:10 ($\alpha_x\beta\gamma_z$ -Untereinheiten) bzw. 1:1 ($\alpha_x\beta\gamma$ -Untereinheiten) gemischt. Etwa 50 nl cRNA-Gemisch wurden in die einzelnen Oozyten injiziert, anschließend folgte nochmals eine Inkubation für

24 Stunden in ND96-Lösung, die durch Zusatz von Gentamycin eine bakterielle Kontamination vermeiden sollte. Danach konnten die Oozyten für die Messungen verwendet werden.

2.5.1.3 Messlösungen

Die Baldrian-Extrakte wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml vermessen. Dafür mussten Stammlösungen von 5 mg Extrakt/100 µl DMSO hergestellt und mit ND96-Lösung auf die entsprechende Konzentration verdünnt werden. Es war zu beachten, dass die Konzentration an DMSO in den Testlösungen einen Wert von 0,5 % nicht überstieg, da dies das Messergebnis beeinflussen würde.

Von den Reinsubstanzen wurden 10 mM und 100 mM Stammlösungen in DMSO hergestellt und vor der Messung mit ND96-Lösung auf die entsprechende Konzentration verdünnt.

1 mM GABA-Lösungen (5,2 mg in 50 ml ND96-Lösung) wurden jeden Tag frisch bereitet.

2.5.1.4 Messung mittels Zwei-Mikroelektroden Spannungsklemmtechnik

Der Versuchsaufbau für die Zwei-Mikroelektroden Spannungsklemmtechnik ist in Abbildung 13, Seite 33, schematisch dargestellt. Die Anordnung besteht aus zwei intrazellulären Elektroden (Potential- und Strom-Elektrode) und einem Rückkopplungsverstärker. Alle Messungen werden bei konstantem Potential – dem Haltepotential – durchgeführt. Mit der Potentialelektrode wird das tatsächliche, transmembranäre Potential gemessen und mittels Rückkopplungsverstärker dessen Abweichung vom Haltepotential (-70 mV) bestimmt. Mittels Stromelektrode wird der benötigte Rückkopplungsstrom zur Konstanthaltung der Membranspannung bzw. des Haltepotentials („voltage-clamp“-Prinzip) injiziert.

Um den Unterschied zwischen tatsächlichem Membranpotential und Sollspannung auszugleichen, wird ein Kompensationsstrom (Rückkopplungsstrom) erzeugt, der dem Aktionsstrom (= Strom, der durch die Membran fließt) entgegengerichtet ist. Man spricht vom Prinzip der negativen Rückkopplung.

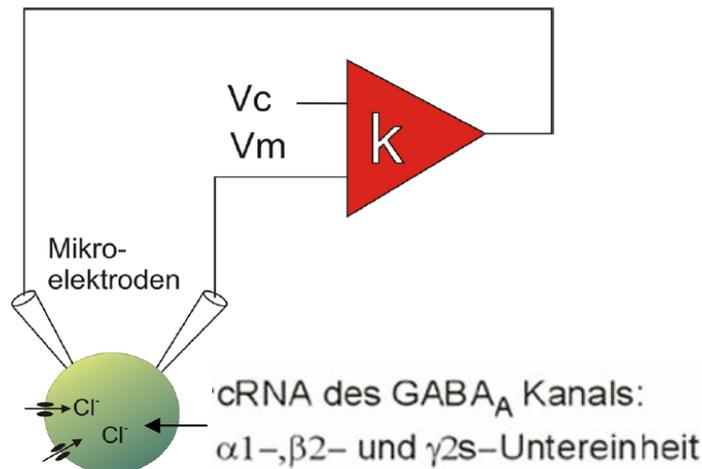


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (aus Hering S, 2004. Pharmakologie Rezeptor-aktivierter Ionenkanäle am Beispiel des GABA_A-Kanals)

Die Messungen wurden in einer modifizierten Mikroperfusionskammer mit raschem Perfusionssystem durchgeführt (Hering 1998).

In jedem Experiment wurde zuerst GABA in einer Konzentration zwischen 5 und 10 % der maximal ausgelösten Modulation appliziert (EC₅₋₁₀), danach wurde die Verstärkung des durch GABA ausgelösten Cl⁻-Stroms (I_{GABA}) durch Extrakte oder Reinsubstanzen gemessen. Die angegebenen Werte repräsentieren Mittelwerte aus zumindest vier Experimenten. Statistische Signifikanz wurde mittels Student T-Test ermittelt (Khom et al. 2007).

2.5.2 Elevated Plus Maze Test

Um Baldrian-Extrakte und daraus isolierte Reinsubstanzen auch *in vivo* zu testen, wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikum der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Hattesoht 2007) und am Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida, Untersuchungen auf anxiolytische Aktivität im Tierversuch mittels Elevated Plus Maze (EPM) Test durchgeführt.

Das Elevated Plus Maze-Modell ist geeignet, das Angstverhalten von Mäusen zu beobachten und so die anxiolytische oder anxiogene Wirkung von Substanzen zu untersuchen.

Die Versuche wurden an weiblichen und männlichen NMRI Mäusen durchgeführt (Hattesoht 2007). Die Extrakte und Reinsubstanzen wurden zwei Stunden vor der Applikation in EtOH gelöst und mit Leitungswasser verdünnt. Danach wurde die Probe mittels Magnetrührer zwei Stunden gerührt, um eine klare Lösung bzw. eine feine Suspension zu erhalten. Die Applikation erfolgte peroral mittels Schlundsonde (Hattesoht 2007). Es wurden jeweils 10 ml/kg KG Probelösung verabreicht.

Bei dem EPM-Modell handelt es sich um ein Kreuz mit zwei offenen und zwei geschlossenen Stegen („Armen“), das sich in 30 cm Abstand vom Boden befindet (Hattesohl 2007).



Abbildung 14: Versuchsaufbau des Elevated Plus Maze Test (Hattesohl 2007)

Die Mäuse werden in die Mitte des Kreuzes gesetzt und über einen definierten Zeitraum beobachtet. Während der Testperiode werden die Zahl der Eintritte auf die offenen und in die geschlossenen Arme sowie die Zeit des Aufenthalts auf den offenen und in den geschlossenen Armen erfasst. Ausgewertet werden der prozentuelle Anteil der Eintritte auf die offenen Arme ($n_{\text{offene Arme}}$) an der Zahl der Gesamteintritte und der prozentuelle Anteil der Zeit auf den offenen Armen ($t_{\text{offene Arme}}$) an der Gesamtzeit. Anxiolytisch wirkende Substanzen erhöhen beide Parameter. Als Positivkontrolle wurde Diazepam in einer Konzentration von 1,5 mg/kg und 2 mg/kg KG verabreicht.

2.6 Permeabilitätsstudien durch ein Blut-Hirn-Schranken-Modell

In Kooperation mit dem Department für Pharmazeutische Chemie, Universität Wien, wurden für Valerensäure und ihre Derivate - Acetoxyvalerensäure und Hydroxyvalerensäure - Untersuchungen bezüglich Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) durchgeführt. Es wurde dafür ein etabliertes *in vitro* BHS Modell (Transwell®), basierend auf *ECV304* Zellen, verwendet.

Das Modell besteht aus einer 6-Well-Platte mit Filter-Inserts. Die Endothelzellen wachsen auf der Oberfläche, die mit Kollagen beschichtet ist, um den Zellen eine bessere Anhaftung und damit besseres Wachstum zu ermöglichen.

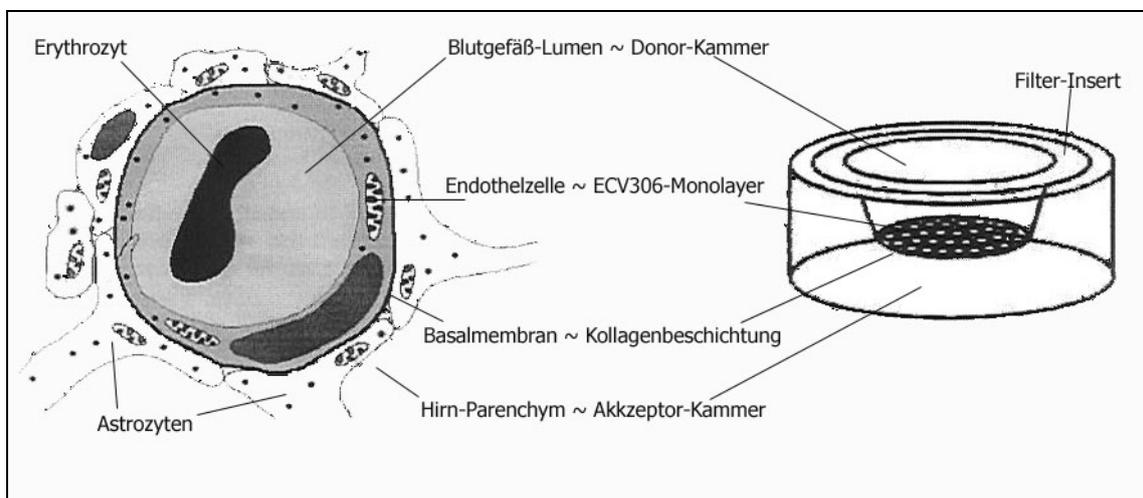


Abbildung 15: Vergleich der *in vivo* Blut-Hirn-Schranke mit dem Transwell®-Modell (<http://www.univie.ac.at/~a9340479>)

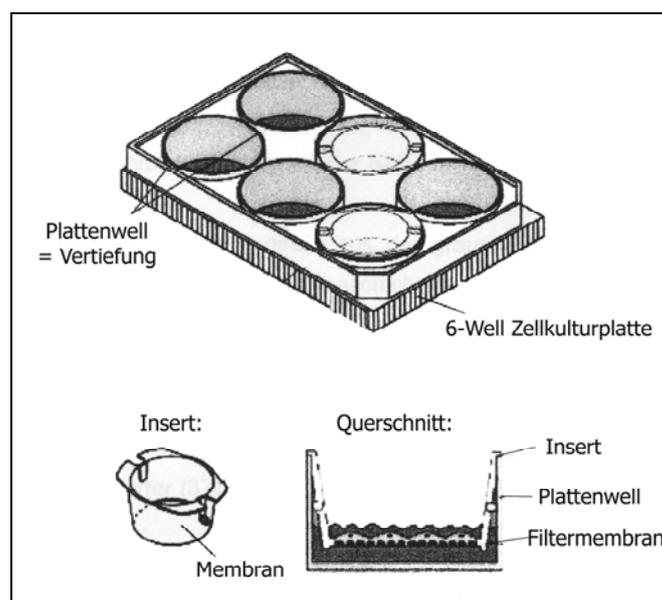


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Transwell®-Modells (Falcon® Gebrauchsinformation)

Die Zell-Monolayer wurden im Department für Pharmazeutische und Medizinische Chemie angezüchtet (Neuhaus et al. 2008). Während der Zellanzucht wurde die Integrität und somit die Dichtigkeit der Zellschicht mittels unterschiedlicher mikroskopischer Techniken (SEM, TEM, ESEM) kontrolliert (Neuhaus et al. 2008). Zusätzlich wurde der transendotheliale Widerstand (TEER) der Zellschicht bestimmt. Man misst dabei die Barriere der Zellschicht gegenüber kleinen Ionen. Im Zellmedium wird durch zwei Elektroden ein elektrisches Feld angelegt. Eine Elektrode befindet sich oberhalb der Zellschicht (im Insert), die andere im Well unterhalb. Der Widerstand wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{TEER } [\Omega \cdot \text{cm}^2] = \text{Widerstand (der Zellschichtmembran)} \times \text{Fläche des Inserts (4,2 cm}^2\text{)}$$

Permeabilitätsstudien

Nach der entsprechenden Inkubation wurden die Zellmonolayer-Inserts in das erste Well der 6-Well-Platte umgesetzt. Jedes Well war mit 3,00 ml Transportpuffer befüllt. In das Insertlumen wurden 2,00 ml der zu untersuchenden Substanz-Lösung pipettiert. Diese Lösung enthielt Diazepam als internen Standard, die Testsubstanz(en) und C6-Medium (Neuhaus et al. 2006, Neuhaus et al. 2008). Die Konzentration aller eingesetzten Substanzen betrug 100 μM . Dafür wurden die Stammlösungen (10 mM in MeOH) entsprechend mit C6-Medium verdünnt. Nach jeweils 20 Minuten wurde das Insert (= Donorkammer) in das nächste Well (= Akzeptorkammer) transferiert.

Der Inhalt der einzelnen Akzeptorkammern, der Urprobe und des Überstands im Insert wurde nach Beendigung des Versuchs mittels HPLC analysiert (Kapitel 2.3.2, Seite 25). Davor mussten die Proteine aus der Lösung gefällt werden. Dies geschah mit 4 °C kaltem Acetonitril im Verhältnis 1:3 und anschließender Kühlung auf 4 °C für 30 Minuten. Danach wurde die Probelösung zentrifugiert und konnte in die HPLC injiziert werden.

In jedem Versuch wurden auch Blindwertbestimmungen (mit Inserts ohne Zellschicht) durchgeführt, um eventuelle Variabilitäten durch die Insertmembran bzw. die Kollagenbeschichtung der Inserts zu berücksichtigen.

Es wurden jeweils drei Zellwert- und drei Blindwert-Bestimmungen durchgeführt.

Berechnung der Clearance und des Permeabilitätskoeffizienten

Die Clearance [μl] (=Volumen der durchgegangenen Probelösung) und der Permeabilitätskoeffizient [$\mu\text{m}/\text{min}$] wurden als Transportparameter angeführt:

Um dies zu berechnen, wurde die Konzentration der Menge der während 20 Minuten durchgegangenen Probe durch die Konzentration der Probe im Insert dividiert.

$$\text{Clearance } [\mu\text{l}] = \frac{(C_{Bn} \times V_B)}{C_A - ((V_B/V_A) \times \Sigma C_{Bn-1})}$$

C_{Bn}Konzentration der Probelösung im Well (Akzeptorkammer, basolaterale Kammer)

V_BVolumen des Wells (Akzeptorkammer, basolaterale Kammer)

C_AKonzentration der Probelösung in der Donorkammer (= apikale Kammer)

V_AVolumen der Donorkammer (= apikale Kammer)

Da die Menge der Testsubstanz in der Donorkammer/Insert im Verlauf des Versuchs abnahm (Konzentrationsausgleich zw. Insert und Well), muss der C_A -Wert zu jedem gemessenen Zeitpunkt korrigiert werden. Daher wird die Summe aller Konzentrationen der Wells, die vor dem gemessenen liegen (ΣC_{Bn-1}) mit dem Volumen multipliziert und von der Konzentration in der Donorkammer abgezogen. Das Gesamtvolumen der Probe zu jedem Zeitpunkt der Messung wurde durch Aufsummierung des durchgegangenen Probenvolumens bis zu diesem Zeitpunkt ausgerechnet. Das Clearancevolumen (Volumen der durchgegangenen Probelösung) sollte linear mit der Zeitdauer des Experiments ansteigen. Das Volumen wurde in einem Diagramm als Funktion der Zeitpunkte dargestellt, die Steigung wurde durch lineare Regressionsanalyse bestimmt. Die erhaltene Steigung wird als PS-Wert bezeichnet (P...permeability, S...surface).

Der PS-Wert des Monolayers kann wie folgt berechnet werden:

$$1/PS_{\text{cell}} = 1/PS_{\text{all}} - 1/PS_{\text{controll}}$$

PS_{all} PS-Wert der Zellwertbestimmung

PS_{controll} PS-Wert der Blindwertbestimmung

Um den Permeabilitätskoeffizienten (PE) zu erhalten, wurde der PS_{cell} -Wert durch die Oberfläche des Inserts ($4,2 \text{ cm}^2$) dividiert.

2.7 Pharmakokinetik

Die Untersuchungen zur Pharmakokinetik der Valerensäure wurden am Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber durchgeführt (Hiltscher 2007, Maier-Salamon et al. 2009).

Als Leberspender dienten männliche Wistar- und TR⁻-Ratten. Die Leber des narkotisierten Tieres wird entnommen und an einen künstlichen Kreislauf angeschlossen. Perfusionsmedium (Krebs-Henseleit-Puffer) wird mit konstanter Temperatur (37 °C) über eine Pumpe, die die Peristaltik imitiert, zur Leber geleitet. Nach der Passage wird effluentes Perfusat abgeleitet und gesammelt. Gallentropfen, die aus dem Gallengang kommen, passieren eine Lichtschranke, um so den Gallefluss [mg/g Leber/min] zu berechnen (Hiltscher 2007, Maier-Salamon et al. 2009).

Zu Beginn des Versuchs wurde 30 Minuten mit Medium vorperfundiert und anschließend eine Stammlösung von Valerensäure (10 mM in DMSO) so zugegeben, dass eine Konzentration von 20 µM für 90 Minuten perfundierte. Um den First-Pass-Metabolismus während der Perfusion zu untersuchen, wurden Galle- und Perfusatproben in 5 Minuten-Intervallen gesammelt und mittels HPLC analysiert.

Um zu überprüfen, ob nach erfolgter Perfusion noch Anteile an Valerensäure oder an Metaboliten in der Leber kumulierten, wurde die Leber extrahiert, zentrifugiert und die erhaltenen Proben mittels HPLC analysiert.

Um Information über die Metaboliten der Valerensäure zu erhalten, wurden 5 µl der Galle-Proben sowohl mit 20 µl β-Glukuronidase, als auch - in einem zweiten Versuch - mit 10 µl Sulfatase 24 h bei 37 °C inkubiert. Damit kann festgestellt werden, ob eine Konjugation mit Glukuronsäure oder Schwefelsäure stattfindet. Anschließend wurden die Proben mittels HPLC und Massenspektrometrie analysiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Bioassay-guided Fraktionierung und phytochemische Charakterisierung

3.1.1 Analyse verschieden polarer Extrakte

Ziel der Arbeit war, mittels Bioassay-guided Fraktionierung am GABA_A-Rezeptor wirkende Inhaltsstoffe aus Valerianae radix zu identifizieren bzw. zu isolieren. Dafür sollten eine erste grobe Auftrennung hinsichtlich Polarität und eine erste phytochemische Charakterisierung erfolgen. Durch fortlaufende Extraktion der Droge mit Lösungsmitteln steigender Polarität (siehe Kapitel 2.2.1, Seite 22) wurden ein Petrolether-, ein Ethylacetat-, ein methanolischer- und ein wässriger Extrakt aus Valerianae radix hergestellt sowie Zubereitungen der traditionellen Anwendung - Tinktur und Infus. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1, Seite 22 beschrieben. Diese wurden genauso wie unterschiedlich polare, kommerzielle Extrakte (siehe Kapitel 2.1, Seite 20) bezüglich Qualität und Zusammensetzung nach der Monographie des EuAB analysiert. Das EuAB sieht eine qualitative und quantitative Bestimmung der Sesquiterpensäuren – Valerensäure und Acetoxyvalerensäure – mittels HPLC vor (siehe Kapitel 2.3.2, Seite 25).

Die Quantifizierung erfolgte mittels internen Standards. In der Monographie des Arzneibuchs wurde dafür Dantron (1,8-Dihydroxyanthrachinon) eingesetzt. Da nach Vorschrift der Monographie die Droge extrahiert wird, wir allerdings bereits mit Extrakten arbeiteten, wurde in Vorversuchen über das DEV (4-7:1) eine geeignete Einwaage für die Bestimmung der Extrakte ermittelt. 10 mg in 1,00 ml erwiesen sich als optimal, um ein gut quantifizierbares HPLC-Chromatogramm zu erhalten. Die Berechnung der Sesquiterpensäuren erfolgte unter Berücksichtigung von Einwaage des internen Standards und der Extrakte sowie der erhaltenen Peakflächen der Substanzen mittels angegebener Formel (siehe Seite 25ff.). Der Gehalt von Valerensäure und Acetoxyvalerensäure in Prozent konnte so für jeden Extrakt berechnet werden. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen dar.

Die folgende Abbildung (Abbildung 17, Seite 40) zeigt ein HPLC-Chromatogramm der Quantifizierung eines Baldrian-Extraktes:

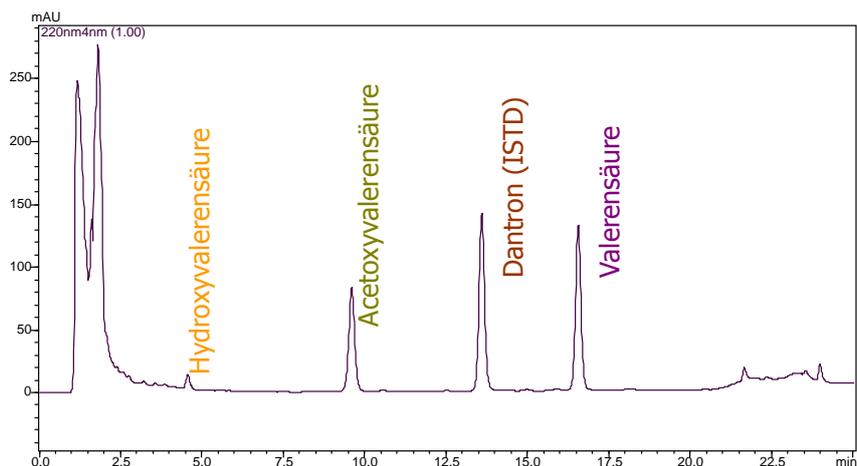


Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm zur quantitativen Erfassung der Sesquiterpensäuren in einem Baldrian-Extrakt mittels internem Standard (ISTD), HPLC-Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25

In Tabelle 6 ist der Gehalt an Sesquiterpensäuren in den einzelnen Extrakten in Prozent angeführt. Die Werte wurden durch Dreifachbestimmungen ermittelt.

Extrakte	Gehalt an Valerensäure [%]	Gehalt an Acetoxyvalerensäure [%]
Petrolether-Extrakt (PE)	3,48	3,80
Ethylacetat-Extrakt (EtOAc)	1,09	2,51
MeOH-Extrakt (MeOH)	0,09	0,10
H ₂ O-Extrakt	--	--
Infus	--	--
Tinktur	0,24	0,31
Ethylacetat-Extrakt (EA)	2,60	3,19
Kommerzielle Extrakte		
1 (Extr.Val.spir.sicc.)	0,44	0,44
2 (Extr.Val.spir.spiss.)	0,02	0,04
3 (Extr.Val.aqu.spiss.)	--	--
4 (60 % EtOH)	0,14	0,19
5 (70 % EtOH)	0,26	0,25
6 (45 % MeOH)	0,10	0,17
7 (EtOAc)	2,19	0,63
8 (EtOAc)	2,55	2,21
9 (6 + 8)	0,41	0,36
F1 (H ₂ O)	--	0,02
F2 (35 % EtOH)	0,09	0,14
F3 (35 % EtOH)	0,13	0,14
F4 (45 % EtOH)	0,12	0,14
F5 (70 % EtOH)	0,13	0,14

Tabelle 6: Gehalt an VS und AVS in den unterschiedlich polaren Extrakten in %; Herstellung bzw. Charakterisierung der Extrakte vgl. Kapitel 2.1 und 2.2.1, Seite 20 und 22; EA = Ethylacetat-Extrakt,

1 - 9, F1 - F5 = kommerzielle Extrakte

Wie aus Tabelle 6 (Seite 40) ersichtlich wird, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Polarität der Extrakte und dem Gehalt der Sesquiterpensäuren im Extrakt: Polare Extrakte enthielten wenig oder gar keine Sesquiterpensäuren, während apolare Extrakte einen hohen Gehalt an Valerensäure und/oder Acetoxyvalerensäure aufzeigten. Der Petrolether- Extrakt enthielt, genauso wie der Ethylacetat-Extrakt EA, einen hohen Gehalt an Sesquiterpensäuren (**PE**: 3,48 % VS und 3,80 % AVS; **EA**: 2,60 % VS und 3,19 % AVS). Der Unterschied zwischen dem Gehalt der Substanzen in EA und im Ethylacetat-Extrakt EtOAc (1,09 % VS und 2,51 % AVS) ist dadurch erklärbar, dass zweiterer durch fortlaufende Extraktion aus der Droge, die bereits mit Petrolether extrahiert war, hergestellt wurde und daher ein Großteil der Sesquiterpensäuren bereits durch Petrolether extrahiert wurde (vgl. auch Kapitel 2.2.1 und 2.2.2, Seite 22). Mit steigender Polarität nahm der Gehalt an Sesquiterpensäuren ab. Der MeOH-Extrakt enthielt nur mehr 0,1 %, im H₂O-Extrakt sowie im Infus waren keine Sesquiterpensäuren detektierbar. Zusätzlich wurden die Droge-Extrakt-Verhältnisse (DEV) der Extrakte bestimmt. Diese sind in Tabelle 7 zusammengefasst:

Extrakt	DEV
PE	95:1
EtOAc	139:1
MeOH	7:1
H ₂ O	6:1

Tabelle 7: Droge-Extrakt-Verhältnisse (DEV) der durch fortlaufende Extraktion erhaltenen Extrakte (vgl. Kapitel 2.2.1, Seite 22); PE = Petrolether-Extrakt, EtOAc = Ethylacetat-Extrakt, MeOH = methanolischer Extrakt, H₂O = wässriger Extrakt

Das Ergebnis der Quantifizierung der selbst hergestellten Extrakte bestätigte sich durch das der Firmenextrakte: Extrakt **7** und **8** – Ethylacetat-Extrakte – zeigten den höchsten Gehalt an Valerensäure und Acetoxyvalerensäure (**7**: 2,19 % VS und 0,63 % AVS; **8**: 2,55 % VS und 2,21 % AVS). Der ethanolische Extrakt **1** enthielt 0,44 % VS und 0,44 % AVS. Mit steigendem Wasseranteil im Extraktionsmittel und damit mit steigender Polarität nahm auch der Gehalt der Substanzen in den Extrakten ab; bei den Extrakten **4**, **5**, **6**, **F2**, **F3**, **F4** und **F5** handelte es sich um wässrig-ethanolische Extrakte (vgl. Tabelle 2, Seite 21 und Tabelle 6, Seite 40), der Gehalt der Sesquiterpensäuren in diesen Auszügen lag jeweils unter 0,5 %. Wässrige Extrakte (**3**, **F1**) enthielten keine der beiden Substanzen.

Ein möglicher Wirkungsmechanismus für die sedierende und schlaffördernde Wirkung von Baldrian-Extrakten ist eine Modulation des GABA_A-Rezeptors (Hiller und Zetler 1996, Mennini et al. 1993, Ortiz et al. 1999, Santos et al. 1994a, Santos et al. 1994b, Santos et al. 1994c, Sichardt et al. 2007, Wasowski et al. 2002, Yuan et al. 2004). In Kooperation mit dem Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien wurden nun Extrakte und Fraktionen aus *Valeriana radix* hinsichtlich einer Wirkung an diesem Rezeptor untersucht. Es stand ein etabliertes Modell an Frosch-Oozyten der Gattung *Xenopus laevis* zur Verfügung, mit dem durch Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemm-Technik eine GABA_A-Modulation gemessen werden konnte (siehe Kapitel 2.5.1, Seite 31).

Der GABA_A-Rezeptor ist ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal-Rezeptor, dessen natürlicher Ligand, die γ -Aminobuttersäure (GABA), den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS) des menschlichen Organismus darstellt.

Die Synthese von GABA erfolgt in GABA-ergen Neuronen aus Glutamat durch das Enzym Glutamatdecarboxylase. Die Bindung an den Rezeptor, der zu den Cl⁻-Ionenkanalrezeptoren zählt, bewirkt eine Öffnung des Kanals, wodurch es zu einem Cl⁻-Einstrom in die Zelle und somit zu einer Hyperpolarisation kommt. Als Folge davon sinkt die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber depolarisierenden (exzitatorischen) Reizen, da ein Aktionspotential schwerer ausgelöst werden kann. Benzodiazepine binden ebenfalls an den GABA_A-Rezeptor, allerdings an einer anderen Stelle als GABA. Sie bewirken eine allosterische Konformationsänderung und erhöhen dadurch die Affinität des Neurotransmitters zu dem Rezeptor, was zu einer Verstärkung der Wirkung von GABA führt. Sie werden als GABA_A-Modulatoren bezeichnet.

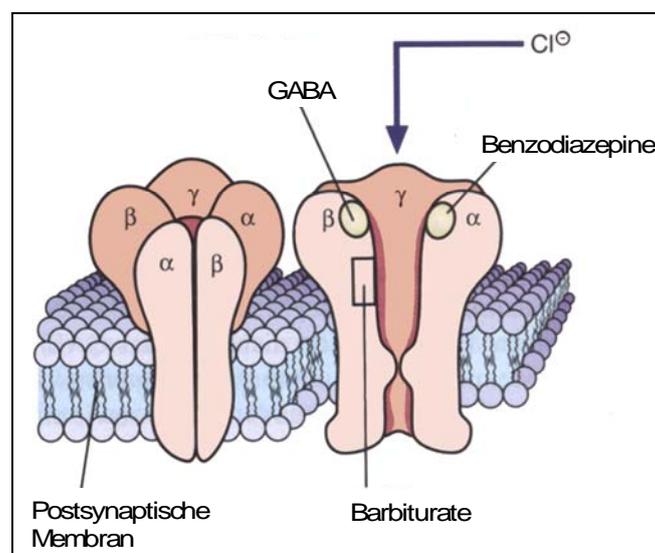


Abbildung 18: Schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors (aus Mutschler et al., Arzneimittelwirkungen, S. 185)

Die Pore des Kanals ist ein Pentamer, das sich aus Protein-Untereinheiten zusammensetzt. Bisher wurden sieben Klassen dieser Untereinheiten beschrieben (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ_1 , ϵ_1 , θ_1 , ρ_{1-3}), die am häufigsten exprimierte Kombination besteht aus zwei α_1 -, zwei β_2 - und einer γ_2 -Untereinheit ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$) (Sieghart 1995, Möhler 2006).

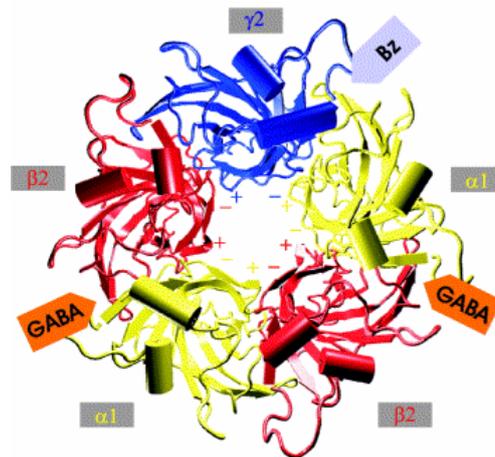


Abbildung 19: Modell des GABA_A-Rezeptors, bestehend aus zwei α_1 -, zwei β_2 - und einer γ_2 -Untereinheit (aus Ernst et al. 2003, Neuroscience 119, 933-943)

Während sich die GABA-Bindungsstelle zwischen der α - und der β -Untereinheit befindet, ist die Bindungsstelle für Benzodiazepine zwischen der α - und der γ -Untereinheit lokalisiert (siehe Abbildung 18, Seite 42 und Abbildung 19). Die Kombination unterschiedlicher Untereinheiten bestimmt die Ligandenerkennung und -bindung sowie die Affinität der Liganden zu einem Rezeptorsubtyp.

Den verschiedenen Klassen der α -Untereinheit konnten unterschiedliche Wirkungen zugeordnet werden: GABA_A-Rezeptoren, die α_1 -Untereinheiten exprimieren, sind Angriffspunkt für sedierende, schlaffördernd wirkende Substanzen, während anxiolytische Aktivität über GABA_A-Rezeptoren mit α_2 -Untereinheiten vermittelt wird. Sowohl α_2 - als auch α_3 -Untereinheiten scheinen muskelrelaxierende Aktivität zu vermitteln (Möhler 2006).

GABA_A-Rezeptoren haben nicht nur spezifische Bindungsstellen für GABA und Benzodiazepine, auch andere Sedativa, wie Barbiturate und Anästhetika, wie Etomidat und Propofol, sind GABA_A-Agonisten (Drexler et al. 2006). Diese Modulatoren beeinflussen den Öffnungszustand des Rezeptors auf unterschiedliche Weise: Benzodiazepine erhöhen die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals, Barbiturate verlängern zusätzlich auch die Öffnungsdauer. Benzodiazepin-Antagonisten (Flumazenil) inhibieren die Wirkung der Benzodiazepine, die GABA-Wirkung bleibt aber unbeeinflusst. Kompetitive GABA-

Antagonisten, wie Bicucullin, verdrängen GABA vom Rezeptor, nicht kompetitive Antagonisten (Picrotoxin) blockieren die Pore des Kanals. Beide Liganden hemmen die GABA-induzierte Hyperpolarisation.

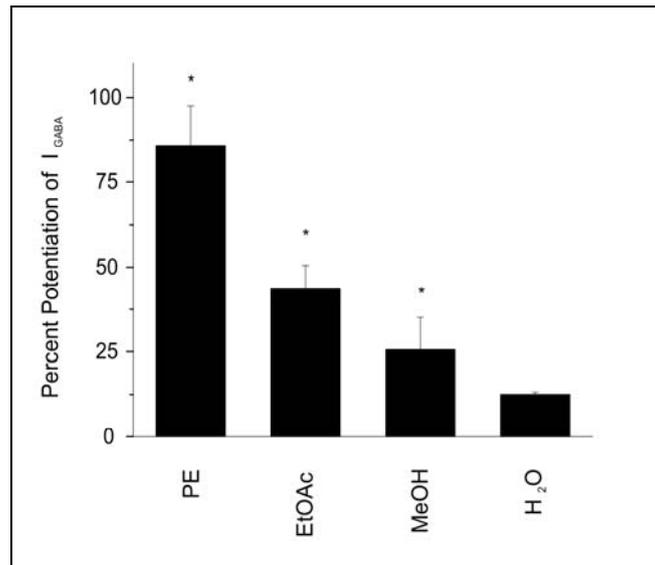
Anhand der unterschiedlich polaren Extrakte (siehe oben) sollte nun getestet werden, ob die durch *Valerianae radix* beschriebene Wirkung am GABA_A-Rezeptor bestätigt werden kann und ob die einzelnen Extrakte Unterschiede in der Modulation zeigen, die sich aufgrund der unterschiedlichen Polarität und Zusammensetzung der Auszüge ergeben könnte. Dadurch sollte mehr Information über die Polarität der am GABA_A-Rezeptor wirksamen Inhaltsstoffe erlangt werden.

Alle Baldrian-Extrakte – sowohl die selbst extrahierten als auch die von Firmen erhaltenen – wurden hinsichtlich ihrer Modulation am GABA_A-Rezeptor-Modell getestet. Es wurden für die Untersuchungen der Baldrian-Extrakte GABA_A-Kanäle mit zwei α_1 -, zwei β_2 -, und einer γ_{2S} -Untereinheit exprimiert (vgl. Kapitel 2.5.1.2, Seite 31), da dies die am häufigsten vorkommende Kombination im menschlichen Zentralnervensystem darstellt (Sieghart 1995, Möhler 2006) und daher für die ersten Testungen der Extrakte sinnvoll erschien.

Die Messkonzentration der Extraktlösungen betrug 100 $\mu\text{g/ml}$. Diese wurde durch Verdünnung der Stammlösungen (5 mg/100 μl DMSO) mit ND96-Lösung jeweils kurz vor dem Experiment hergestellt. Es war wichtig, dass die DMSO-Konzentration in der Messlösung unter 0,5 % lag, da sonst die Messergebnisse verfälscht würden. In jedem Experiment wurde zuerst GABA appliziert, um danach die Verstärkung des durch GABA ausgelösten Cl^- -Stroms (I_{GABA}) zu messen (vgl. Kapitel 2.5.1.4, Seite 32). Alle angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus zumindest vier Messvorgängen dar.

Aus den Versuchen resultierte folgendes Ergebnis: Extrakte, die mit apolaren Lösungsmitteln hergestellt wurden, wie der Petrolether-Extrakt und der Ethylacetat-Extrakt, bewirkten eine stärkere Modulation am GABA_A-Rezeptor als die polaren Extrakte (MeOH- und H₂O-Extrakt), die wenig oder keine Wirkung zeigten.

Abbildung 20 (Seite 45) zeigt mittels Balkengraphik den Effekt der mit verschiedenen polaren Auszugsmitteln hergestellten Extrakte am GABA_A-Rezeptor:



**Abbildung 20: Modulation von I_{GABA} durch verschieden polare Baldrianextrakte an $\alpha_1\beta_2\gamma_2\delta$ GABA_A Kanälen. Testkonzentration: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gemeinsam mit GABA EC₅₋₁₀ siehe Kapitel 2.5.1, Seite 31, (*) zeigt Werte signifikant unterschiedlich zu Null ($p < 0,05$, t-test by ANOVA)
PE = Petrolether-Extrakt, EtOAc = Ethylacetat-Extrakt, MeOH = methanolischer Extrakt, H₂O = wässriger Extrakt**

Durch den Petrolether-Extrakt konnte eine Stimulation von I_{GABA} um 85,8 % gemessen werden, der Ethylacetat-Extrakt bewirkte eine 43,5%ige Verstärkung. Auch durch den methanolischen Extrakt zeigte sich eine positive Modulation, die allerdings geringer ausfiel (25,6 %). Der wässrige Extrakt verstärkte den durch GABA ausgelösten Cl⁻-Strom nicht signifikant (12,5 %). Auch die Messungen der unterschiedlich polaren Firmenextrakte hinsichtlich GABA_A-Modulation resultierten in einem ähnlichen Ergebnis: Extrakte, die mit apolaren Auszugsmitteln hergestellt wurden (7, 8), bewirkten einen positiven Effekt, polare Extrakte (1, 2, 3, 4) hingegen, zeigten keine oder sehr geringe Stimulation. Die folgende Abbildung 21 (Seite 46) zeigt den Effekt, der mit verschieden polaren Auszugsmitteln hergestellten kommerziellen Extrakte 1 - 9 (vgl. Kapitel 2.1, Seite 20) am GABA_A-Rezeptor:

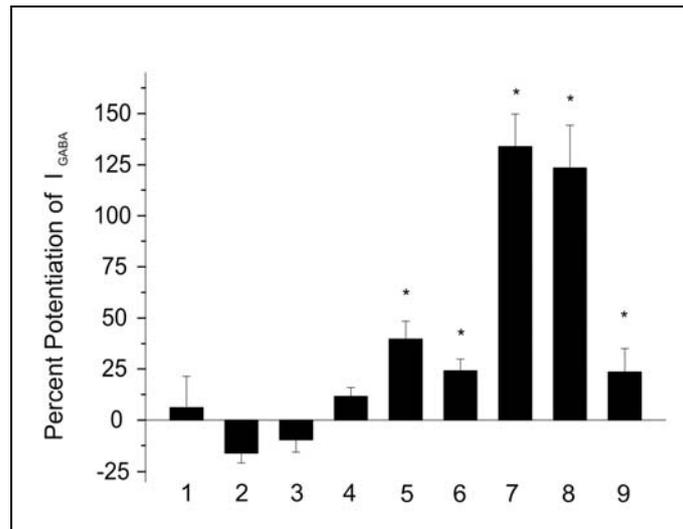


Abbildung 21: Modulation der Cl^- -Ströme an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ GABA_A Rezeptoren durch verschiedene kommerziell erhältliche Baldrian-Extrakte (siehe Kapitel 2.1, Seite 20) in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$. (*) zeigt Werte signifikant unterschiedlich zu Null ($p < 0,05$, t-test by ANOVA)

Bei den Extrakten 7 und 8 handelte es sich um Ethylacetat-Extrakte. Von allen erhaltenen Firmenextrakten waren diese diejenigen mit der geringsten Polarität. Die gemessene Modulation am GABA_A-Rezeptor-Modell betrug 133,9 % für Extrakt 7 und 123,4 % für Extrakt 8. Ebenfalls eine positive Stimulation von I_{GABA} zeigten die Extrakte 5, 6 und 9. Die gemessenen Werte waren allerdings weitaus geringer als die der Ethylacetat-Extrakte. Extrakt 5, ein 70%iger ethanolischer Extrakt, verstärkte I_{GABA} um 39,7 %, Extrakt 6 wurde mit 45%igem Methanol hergestellt, die I_{GABA} -Verstärkung lag bei 24,0 %. Auch Extrakt 9 zeigte eine positive Modulation (23,5 %). Es handelte sich bei diesem Extrakt um eine Mischung von Extrakt 6 + 8. Die Extrakte 1, 2, 3 und 4 zeigten keinen signifikanten Effekt in diesem Modell. Extrakt 1 war ein alkoholischer Siccum-Extrakt, dessen Modulation 6,0 % betrug. Bei Extrakt 2 handelte es sich um einen alkoholischen Spissum-Extrakt, die gemessene Stimulation lag bei -15,8 % von I_{GABA} (es kam hier also zu einer leicht entgegengesetzten Wirkung). Der wässrige Spissum-Extrakt 3 schwächte den Cl^- -Strom ebenfalls um -9,7 % ab und die Modulation des Extraktes 4 (60 % EtOH) wurde mit 11,5 % gemessen.

Die folgende Abbildung 22, Seite 47, zeigt typische Ströme, die während eines Experiments gemessen wurden. Ströme mit einem Balken wurden durch GABA ausgelöst, Ströme mit zwei Balken stellen die Modulation von I_{GABA} durch die Baldrian-Extrakte 6 (45 % MeOH) und 7 (EtOAc) dar.

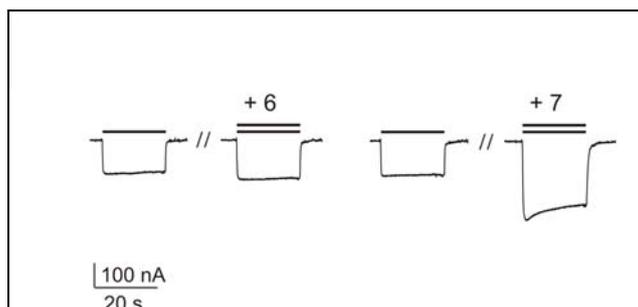


Abbildung 22: Typische Ströme der Modulation von I_{GABA} durch Baldrian-Extrakte am Beispiel der Extrakte 6 und 7 an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Kanälen von GABA EC₅₋₁₀. Kontrollströme (GABA, ein Balken) und Koapplikations-Ströme (GABA + Extrakt, zwei Balken); siehe Kapitel 2.5.1.4, Seite 32

Um eine mögliche Korrelation zwischen der gemessenen Stimulation des GABA_A-Rezeptors und den Ergebnissen der phytochemischen Analyse der Baldrian-Extrakte zu überprüfen, musste der Gehalt an Sesquiterpensäuren, der mittels HPLC bestimmt worden war (siehe Tabelle 6, Seite 40), in die Konzentration in der vermessenen Lösung umgerechnet werden. Tabelle 8 zeigt die Konzentrationen der beiden Sesquiterpensäuren in der Messlösung [μ M] zusammen mit der jeweiligen Modulation am GABA_A-Rezeptor-Modell für jeden der untersuchten Extrakte:

Kommerzielle Extrakte	DEV	Konzentration an VS in der Testlösung [μ M]	Konzentration an AVS in der Testlösung [μ M]	Verstärkung von I_{GABA} [%] Test-Konzentration 100 μ g Extrakt/ml
1 (Extr.Val.spir.sicc.)	*	1,90	1,50	+ 6,0 \pm 15,4
2 (Extr.Val.spir.spiss.)	*	0,10	0,13	- 15,8 \pm 4,9
3 (Extr.Val.aqu.spiss.)	*	--	--	- 9,7 \pm 5,7
4 (60 % EtOH)	*	0,61	0,64	+ 11,5 \pm 4,4
5 (70 % EtOH)	*	1,12	0,86	+ 39,7 \pm 8,8
6 (45 % MeOH)	*	0,42	0,57	+ 24,0 \pm 5,8
7 (EtOAc)	*	9,37	2,16	+ 133,9 \pm 15,9
8 (EtOAc)	*	10,90	7,58	+ 123,4 \pm 20,9
9 (6 + 8)	*	1,75	1,23	+ 23,5 \pm 11,7
Eigene Extrakte unterschiedlicher Polarität				
PE	95:1	14,86	13,01	+ 85,8 \pm 11,8
EtOAc	139:1	4,68	6,43	+ 43,5 \pm 7,0
MeOH	7:1	0,40	0,33	+ 25,6 \pm 9,5
H ₂ O	6:1	--	--	+ 12,5 \pm 0,6

* DEV nicht bekannt

Tabelle 8: Konzentration der Sesquiterpensäuren in der Messlösung (vgl. Kapitel 2.5.1.3, Seite 32), DEV und Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren (vgl. Kapitel 2.5.1.4, Seite 32) der unterschiedlich polaren Extrakte (1 - 9 = kommerzielle Extrakte, vgl. Seite 20)

Es zeigte sich deutlich ein Zusammenhang zwischen Polarität der Extrakte und Wirkung am Rezeptor - und somit auch ein Zusammenhang zwischen Gehalt bzw. Zusammensetzung der Sesquiterpensäuren und Rezeptoraktivität.

Extrakt **7** zeigte die stärkste Stimulation von I_{GABA} (133,9 %), die Konzentrationen der Sesquiterpensäuren in der gemessenen Lösung betragen 9,37 μM VS und 2,16 μM AVS. Interessanterweise waren die Sesquiterpensäure-Konzentrationen (vor allem jene der AVS) von Extrakt **8** höher (10,90 μM VS und 7,58 μM AVS), I_{GABA} wurde allerdings zu 123,4 % verstärkt. Der PE-Extrakt enthielt noch höhere Konzentrationen an VS (14,86 μM) und AVS (13,01 μM) und zeigte eine positiv modulierende Wirkung von 85,8 %.

Signifikante Werte der Verstärkung von I_{GABA} wurden außerdem durch den EtOAc-Extrakt gemessen (43,5 %), in der Messlösung waren 4,68 μM VS und 6,43 μM AVS enthalten. Extrakt **5**, **6**, **9** und der MeOH-Extrakt enthielten geringere Konzentrationen der beiden Sesquiterpensäuren, was auch in einer geringeren Stimulation von I_{GABA} resultierte (vgl. Tabelle 8, Seite 47). Die Extrakte **1**, **2**, **3** und der wässrige Extrakt, in denen wenig oder nicht nachweisbare Mengen an Sesquiterpensäuren gefunden wurden, zeigten auch keine Stimulation am $GABA_A$ -Rezeptor-Modell.

Zusammenfassend bewirkten jene Extrakte, die einen hohen Gehalt an Sesquiterpensäuren, (vor allem Valerensäure) enthielten, eine starke Stimulation des $GABA_A$ -Rezeptors, während polare Extrakte mit wenig oder keinen Sesquiterpensäuren auch keine Wirkung am Rezeptor zeigten.

3.1.2 Semiquantitative Bestimmung des GABA-Gehalts in den Extrakten

Valerianae radix enthält, wie viele andere Pflanzen Aminosäuren, unter anderem auch γ -Aminobuttersäure (GABA). Diese ist der natürliche Ligand des $GABA_A$ -Rezeptors.

Die Aminosäure ist aber, wenn sie exogen zugeführt wird, zu polar, um *in vivo* die Blut-Hirnschranke zu passieren und in das Zentralnervensystem des menschlichen Organismus zu gelangen, um dort für eine sedierende Wirkung verantwortlich zu sein (Hespe et al. 1969).

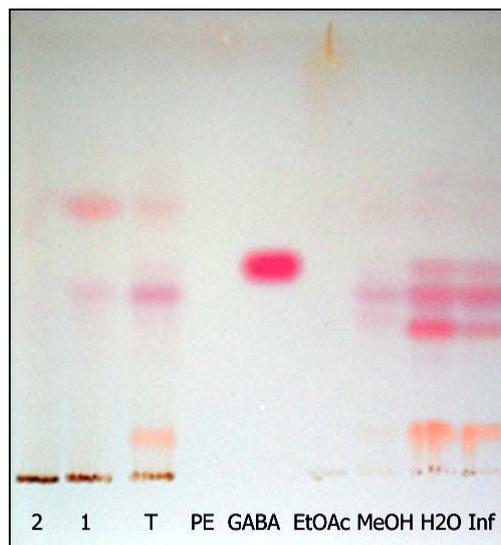
Da die Substanz am *in vitro* Rezeptor-Modell eine positive Modulation bewirken würde, war es wichtig zu analysieren, ob und in welcher Konzentration GABA in den untersuchten Baldrian-Extrakten vorhanden war.

Zuerst wurde mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt, welche der verwendeten Baldrian-Extrakte die Aminosäure enthielten. Ein bereits etabliertes Fließmittelsystem nach Wagner und Blatt (1996) diente als mobile Phase (vgl. Kapitel 2.3.1, Seite 24). Von jedem Extrakt wurde eine Lösung von 5 mg/ml in MeOH hergestellt, um 10 μl davon auf die

DC-Platte aufzutragen. 10 µl einer GABA-Lösung (1 mg/ml) wurden ebenfalls aufgetragen. Nach Entwickeln der Platte wurde diese mit Ninhydrin-Reagens besprüht und anschließend für 5 -10 Minuten bei 100 °C getrocknet. Die Detektion erfolgte im sichtbaren Licht (vgl. Seite 24).

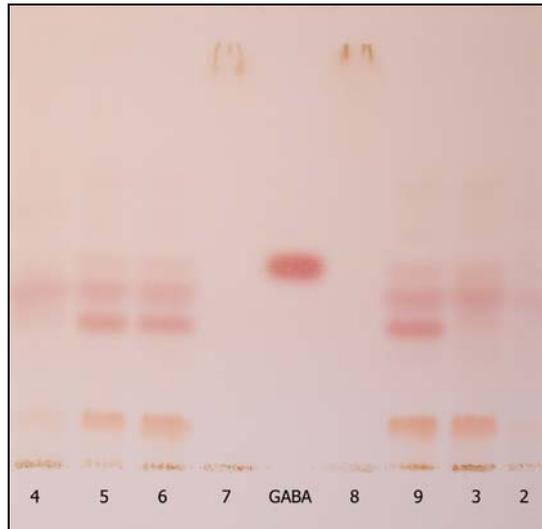
Wie Abbildung 23 und Abbildung 24 (Seite 50) zeigen, war GABA nicht in allen Extrakten enthalten. Von den selbst hergestellten Extrakten enthielten nur der wässrige Extrakt (H₂O) und das Infus (Inf) die Aminosäure. Weder im PE-Extrakt noch im EtOAc-Extrakt oder im MeOH-Extrakt konnte GABA detektiert werden. Auch in der Tinktur (T) war GABA nicht nachweisbar. In den kommerziellen Extrakten **1** (Extr.Val.spir.sicc.), **2** (Extr.Val.spir.spiss.), **7** (EtOAc) und **8** (EtOAc) waren auch keine Aminosäuren enthalten.

In folgenden kommerziellen Extrakten wurde GABA mittels Dünnschichtchromatographie detektiert: **3** (Extr.Val.aqu.spiss.), **4** (60 % EtOH), **5** (70 % EtOH), **6** (45 % MeOH), **9** (6 + 8)



**Abbildung 23: DC-Chromatogramm zur Detektion von GABA in Baldrian- Extrakten
(Bedingungen siehe Kapitel 2.3.1, Seite 24)**

**1, 2 = kommerzielle Extrakte, T = Tinktur, PE, EtOAc, MeOH, H₂O = eigene Extrakte, Inf = Infus
(vgl. Seite 20)**



**Abbildung 24: DC-Chromatogramm zur Detektion von GABA in den kommerziellen Baldrian-Extrakten (Bedingungen siehe Kapitel 2.3.1, Seite 24)
2 - 9 = kommerzielle Extrakte (vgl. Seite 20)**

Da nun bekannt war, in welchen Extrakten GABA vorhanden war, sollte bestimmt werden, mit welchem Gehalt die Aminosäure im Extrakt und in welcher Konzentration sie in der Messlösung (für die Untersuchungen am GABA_A-Rezeptor-Modell) enthalten war. Dies wurde durch semiquantitative Analyse mittels Dünnschichtchromatographie berechnet. Hierfür wurden drei GABA-Lösungen (0,2; 0,05 und 0,025 mg/ml MeOH) und jeweils drei Extrakt-Lösungen (20; 10 und 5 mg/ml MeOH) hergestellt (vgl. Kapitel 2.3.1.1, Seite 25).

Auf einer DC-Platte wurden jeweils 5 µl der drei verschiedenen konzentrierten Lösungen von GABA und der drei Lösungen des jeweiligen Extraktes nebeneinander aufgetragen. Nach erfolgter Detektion erschienen die Banden von GABA im Extrakt, je nach enthaltener Konzentration, unterschiedlich intensiv gefärbt. Die Intensität der einzelnen Zonen der Extrakte und derer der Reinsubstanz wurden miteinander verglichen. Zur Auswertung wurden die Einwaagen der zwei Lösungen herangezogen, deren GABA-Zonen annähernd gleiche Intensität zeigten. So konnte semiquantitativ über den prozentuellen Gehalt an GABA im Extrakt die Konzentration in der Messlösung für die GABA_A-Testungen berechnet werden. Wässrige Zubereitungen (Infus, H₂O-Extrakt) enthielten 1,44 µM bzw. 1,53 µM GABA. Die Konzentration in weniger polaren Extrakten (**4, 5, 6 und 9**) war geringer.

In Tabelle 9 (Seite 51) ist der ermittelte Gehalt und die geschätzte Konzentration an GABA zusammengefasst:

Extrakt	Gehalt an GABA im Extrakt [%]	Konzentration von GABA in der Messlösung [μM]
3	0,15	1,44
4	0,06	0,54
5	0,13	1,25
6	0,15	1,45
9	0,11	1,06
H ₂ O	0,16	1,53
Inf	0,15	1,44

Tabelle 9: Gehalt von GABA in den Extrakten und Konzentration in der Messlösung, erfasst durch semiquantitative Bestimmung (siehe Kapitel 2.3.1.1, Seite 25)

3.1.3 Abtrennung von GABA mittels Ionenaustauschchromatographie

Baldrian-Extrakte, die GABA enthalten, würden bei der Testung am Rezeptor-Modell ein falsch positives Ergebnis vortäuschen. Als natürlicher Ligand am GABA_A-Rezeptor bewirkt die im getesteten Extrakt enthaltene Aminosäure eine positive Modulation. *In vivo* kann die exogen zugeführte Substanz allerdings im Zentralnervensystem keine Wirkung auslösen. Daher musste GABA vor der Messung am Rezeptor-Modell von den Extrakten abgetrennt werden.

Dies sollte mit Ionenaustauschchromatographie an einem Kationenaustauscher-Harz erfolgen (vgl. Kapitel 2.3.4.2, Seite 30). Auf ein, wie in Kapitel 2.3.4.2 beschrieben, regeneriertes Kationenaustauscher-Harz wurde die Probelösung aufgebracht und anschließend mit Aqua dest. eluiert, um Fraktion A mit neutralen Komponenten der Probe zu erhalten. Danach folgte Elution mit 6M NH₃ (Fraktion B), die ionische Verbindungen (wie Aminosäuren) enthielt. Da sich bei Vorversuchen herausstellte, dass Aqua dest. als alleiniges Elutionsmittel für die neutrale Fraktion (A) nicht ausreichend war und die Sesquiterpensäuren nicht quantitativ eluiert wurden, sollte die Methode so modifiziert werden, dass durch zusätzliche Elution der neutralen Fraktion (A) mit MeOH und Ethylacetat die vollständige Elution der Substanzen erreicht wurde. Ob die Elution der Valerensäure quantitativ erfolgte, wurde folgendermaßen überprüft:

3.1.3.1 Wiederfindungsrate der Valerensäure

0,95 mg Valerensäure wurden in 2,00 ml 50 %igem EtOH gelöst. 1,00 ml dieser Lösung wurde auf das vorbereitete Ionenaustauscherharz (siehe Kapitel 2.3.4.2, Seite 30) aufgebracht. Danach begann die Elution mit 5 RV Aqua dest., 5 RV MeOH, 5 RV Ethylacetat

und anschließend mit 5 RV 6M NH₃. Die Eluate wurden separat gesammelt, am Rotavapor zur Trockene gebracht, in 1,00 ml MeOH gelöst und anschließend mittels HPLC analysiert (Bedingungen siehe Kapitel 2.3.2, Seite 25). Es wurden jeweils 20 µl injiziert. Der prozentuelle Anteil der Peakflächen der einzelnen Fraktionen an der Größe der Gesamt-Peakfläche der Valerensäure vor der Elution wurde für die Wiederfindung herangezogen. Die Peakfläche von 0,95 mg Valerensäure in 1,00 ml MeOH wurde für 100 % angenommen.

In die H₂O-Fraktion eluierten 60,7 % der eingesetzten Valerensäure, 22,9 % waren in der MeOH-Fraktion enthalten und 14,9 % in der EtOAc-Fraktion. In Fraktion B war keine Valerensäure zu finden. Es konnten insgesamt 98,5 % der eingesetzten Valerensäure nach Filtration über das Ionenaustauscherharz erhalten werden.

Das Ergebnis ist in Tabelle 10 zusammengefasst:

Fraktion	Anteil am Gesamtgehalt [%]	Summe [%]
H ₂ O	60,7	98,5
MeOH	22,9	
EtOAc	14,9	
6M NH ₃	0	--

Tabelle 10: Wiederfindungsrate der Valerensäure [%] nach Filtration über ein Ionenaustauscherharz (siehe Kapitel 2.3.4.2, Seite 30)

Um zu überprüfen, ob ein vergleichbares Ergebnis - eine nahezu quantitative Elution der Valerensäure - bei Filtration eines Baldrian-Extraktes über das Ionenaustauscher-Harz erhalten wird, wurde der kommerzielle Extrakt 4 (60 % EtOH) (vgl. Tabelle 2, Seite 21) mit einer definierten Menge an Valerensäure dotiert: 42,71 mg des Extrakts wurden in 2,00 ml EtOH gelöst, eine Lösung von 8,04 mg Valerensäure in 2,00 ml EtOH zugesetzt und anschließend mit 4,00 ml H₂O versetzt. In drei Ansätzen wurden jeweils 2,00 ml der Lösung auf das vorbereitete Ionenaustauscherharz (vgl. Kapitel 2.3.4.2, Seite 30) aufgebracht und mit 5 RV Aqua dest., 5 RV MeOH, 5 RV EtOAc und 5 RV NH₃ eluiert. Die ersten drei Fraktionen wurden vereinigt und am Rotavapor unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in 1,00 ml MeOH gelöst und mittels HPLC analysiert. Wiederum wurde der prozentuelle Anteil der Peakfläche von Valerensäure der vereinigten ersten drei Fraktionen an der Größe der Peakfläche der Valerensäure im Extrakt (im Extrakt enthaltene VS + zugesetzte VS) vor der Elution berechnet (vgl. Versuch mit der Reinsubstanz, Seite 51). 100 % entsprachen der Peakfläche des Extraktes mit zugesetzter

Valerensäure vor der Elution. In Tabelle 11 ist das Ergebnis zusammengefasst. Aus den drei Ansätzen ergab sich ein mittlerer Gesamtgehalt von 96,2 % Valerensäure.

Versuch	Anteil am Gesamtgehalt VS [%]
1	94,3
2	97,8
3	96,5
Ø	96,2

Tabelle 11: Wiederfindungsrate der VS + zugesetzter VS [%] nach GABA-Abtrennung aus einem Baldrian-Extrakt mittels Ionenaustauscherharz (siehe Kapitel 2.3.4.2, Seite 30)

Da unser Ziel war, nach Elution eines Baldrian-Extraktes die enthaltene Valerensäuremenge quantitativ zu erhalten, wurde in einem dritten Versuch der kommerzielle Extrakt 4 (vgl. Tabelle 2, Seite 21) ohne Zugabe von Valerensäure nach dem gleichen Schema eluiert.

Es wurden 40,74 mg Extrakt in 4,00 ml EtOH gelöst, mit 4,00 ml Aqua dest. verdünnt und in drei Ansätzen je 2,00 ml der Lösung auf den Ionenaustauscher aufgebracht, um diese in gleicher Weise zu eluieren. Die ersten drei Fraktionen (H₂O, MeOH, EtOAc) wurden, wie im vorherigen Versuch, vereinigt, am Rotavapor zur Trockene gebracht und anschließend in 1,00 ml MeOH gelöst und mittels HPLC analysiert (siehe oben). 100 % entsprachen wiederum der Fläche der Substanz im Extrakt vor der Elution. Aus den drei Versuchen ergab sich ein mittlerer Gesamtgehalt von 92,1 % Valerensäure in der Fraktion nach der Elution.

Versuch	Anteil am Gesamtgehalt VS [%]
1	89,6
2	94,1
3	92,8
Ø	92,1

Tabelle 12: Wiederfindungsrate der Valerensäure [%] nach GABA-Abtrennung von einem Baldrian-Extrakt mittels Ionenaustauscher (siehe Kapitel 2.3.4.2, Seite 30)

Dieses Ergebnis zeigte, dass über 90 % der ursprünglichen Valerensäure-Konzentration nach der GABA-Abtrennung im Extrakt enthalten blieben.

3.1.3.2 Abtrennung von GABA aus den polaren Baldrian-Extrakten

Da von den Extrakten, die GABA enthielten, nur die Extrakte **5**, **6** und **9** am Rezeptormodell eine signifikante Modulation zeigten (vgl. Kapitel 3.1.1, Seite 39ff.), wurde GABA von diesen abgetrennt. Danach sollten diese Extrakte (ohne GABA) nochmals vermessen werden, um zu überprüfen, ob die anfangs gemessene Verstärkung von I_{GABA} am Rezeptor durch die im Extrakt enthaltene Aminosäure zustande kam, oder andere Inhaltsstoffe in den Extrakten dafür verantwortlich sind.

Es wurden jeweils 30 mg in 3,00 ml EtOH und 3,00 ml Aqua dest. gelöst. In zwei Ansätzen wurde jeder der drei Extrakte über das vorgereinigte Ionenaustauscherharz eluiert (siehe Kapitel 2.3.4.2, Seite 30). Dafür wurden 2,00 ml der Extrakt-Lösung auf den Ionenaustauscher aufgebracht und anschließend mit 5 RV H_2O , 5 RV MeOH, 5 RV EtOAc eluiert, diese Fraktionen wurden vereinigt und als Fraktion A bezeichnet. Danach wurde mit 5 RV 6M NH_3 eluiert, um Fraktion B zu erhalten.

Die Abtrennung von GABA wurde durch DC-Analyse kontrolliert. Dies zeigte, dass Fraktion A keine ionischen Verbindungen enthielt. In Fraktion B hingegen konnten die Aminosäuren, inklusive GABA, detektiert werden (siehe Abbildung 25).

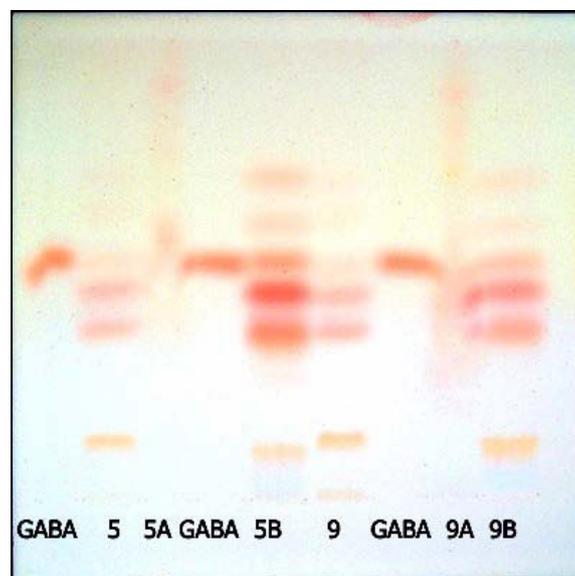


Abbildung 25: DC-Chromatogramm nach erfolgter GABA-Abtrennung aus den Extrakten 5 und 9 mittels Ionenaustauscher (Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.4.2, Seite 24), 5 = kommerzieller Baldrianextrakt (70 % EtOH), 5A = Fraktion A, 5B = Fraktion B; 9 = kommerzieller Baldrianextrakt (45 %MeOH/EtOAc), 9A = Fraktion A, 9B = Fraktion B

Die Messung der Fraktionen 5A, 6A und 9A am GABA_A -Rezeptor-Modell bewirkte keine signifikante Modulation von I_{GABA} .

3.1.4 Anreicherung der Sesquiterpensäuren mittels VLC

Da nach dem ersten Screening der verschiedenen polaren Extrakte (eigene Extrakte sowie kommerzielle Extrakte) hinsichtlich Modulation des GABA_A-Rezeptors eine Korrelation zwischen Polarität und Stimulation gefunden wurde, folgten weitere Untersuchungen: Ein apolarer Extrakt, der am Rezeptor gute Wirkung zeigte, sollte fraktioniert werden, um dadurch mehr Information über die Polarität der (am GABA_A-Rezeptor) wirksamen Substanzen, zu erhalten. Obwohl der Petrolether-Extrakt die stärkste Wirkung zeigte, fiel die Entscheidung - auf Grund des besseren Droge-Extrakt-Verhältnisses - auf den Ethylacetat-Extrakt EA (vgl. Kapitel 2.2.2, Seite 22).

Dafür wurde eine größere Menge des apolaren Ethylacetat-Extrakt (wie in Kapitel 2.2.2, Seite 22 beschrieben) hergestellt und mittels Vakuumflüssig-Chromatographie fraktioniert. Es wurden 5,0 g EA-Extrakt in CH₂Cl₂ gelöst, auf Kieselgel aufgezogen und nach Verdunsten des Lösungsmittels auf die mit Kieselgel gepackte Säule aufgebracht (siehe Kapitel 2.3.3, Seite 28) und jeweils mit 100 ml mobiler Phase eluiert, wobei nach vier Fraktionen Dichlormethan eine langsame Steigerung der Polarität durch Zusatz von MeOH folgte. Zwischen den Fraktionen wurde das Elutionsmittel durch Unterdruck aus der Säule entfernt. Insgesamt resultierten 10 Fraktionen.

Die nachfolgende Tabelle zeigt das Gewicht der einzelnen Fraktionen:

Fraktionen	Elutionsmittel	Gewicht [mg]
Fraktion 1	CH ₂ Cl ₂ (100 %)	835
Fraktion 2	CH ₂ Cl ₂ (100 %)	795
Fraktion 3	CH ₂ Cl ₂ (100 %)	442
Fraktion 4	CH ₂ Cl ₂ (100 %)	148
Fraktion 5	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (90:10)	597
Fraktion 6	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (80:20)	485
Fraktion 7	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (70:30)	334
Fraktion 8	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (60:40)	67
Fraktion 9	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (50:50)	30
Fraktion 10	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:H ₂ O (40:50:10)	114
Nachwasch	MeOH:H ₂ O (50:50)	379
Gesamtgewicht		4243

Tabelle 13: Elutionsmittel und Gewicht der erhaltenen Fraktionen durch VLC
(siehe Kapitel 2.3.3, Seite 28)

Die Fraktionen wurden hinsichtlich Stimulation des GABA-induzierten Cl⁻-Stroms an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ vermessen. Es zeigte sich folgendes Ergebnis: Die ersten vier Fraktionen (100 % CH₂Cl₂) bewirkten eine Stimulation des GABA-Stroms, alle nachfolgenden Fraktionen zeigten keinen Effekt. Die Stimulation war in der ersten Fraktion am stärksten und nahm bei den Fraktionen 2 – 4 ab.

Die folgende Abbildung 28 veranschaulicht das Ergebnis in einem Balkendiagramm:

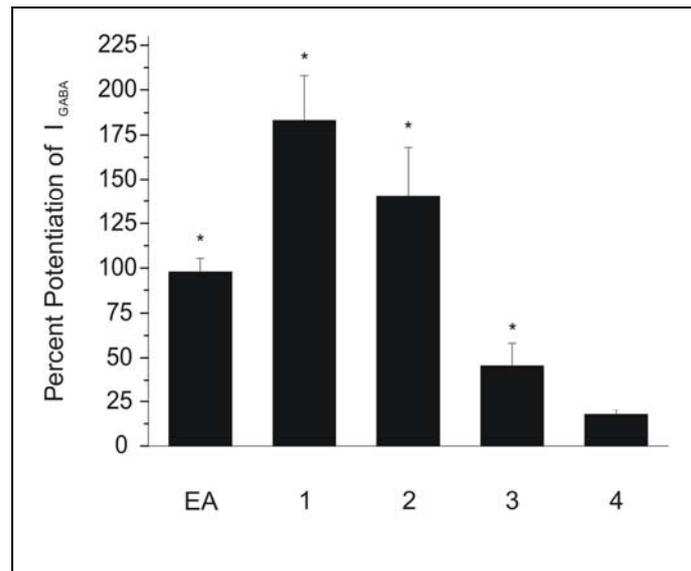


Abbildung 26: Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren (vgl. Kapitel 2.5.1, Seite 32) durch den Ethylacetat Extrakt (EA) und die Fraktionen 1 - 4 erhalten durch VLC (vgl. Kapitel 2.3.3, Seite 28)
Testkonzentration: 100 $\mu\text{g/ml}$

(*) zeigt Werte signifikant unterschiedlich zu Null ($p < 0,05$, t-test by ANOVA)

Der Ethylacetat-Extrakt EA stimulierte den durch GABA ausgelösten Cl⁻-Strom in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ um $94,6 \pm 5,9$ %. Durch Fraktionierung mittels VLC konnten die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe aufgrund ihrer Polarität angereichert werden. Wie Abbildung 26 zeigt, eluierten die wirksamen Verbindungen ausschließlich in die ersten drei (Dichlormethan-) Fraktionen. Die Modulation der Fraktion 1 am GABA_A-Rezeptor in der Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ betrug $183,1 \pm 24,8$ % und war damit am stärksten. Auch Fraktion 2 bewirkte deutlich modulatorische Effekte von I_{GABA}: $140,4 \pm 27,5$ % wurden gemessen. Die dritte Dichlormethan-Fraktion (3) zeigte mit $45,5 \pm 12,7$ % eine geringere aber signifikante Stimulation. Fraktion 4 konnte mit $17,6 \pm 3,5$ % Verstärkung von I_{GABA} keine Signifikanz erreichen. Alle weiteren Fraktionen 5 – 10 waren wirkungslos in diesem Modell und wurden daher in Abbildung 26 nicht berücksichtigt.

Die Werte der Modulation des GABA-induzierten Cl⁻-Stroms an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren aller Fraktionen sind in folgender Tabelle 14 (Seite 57) aufgelistet:

Fraktion	Modulation von I_{GABA} [%]
EA	94,6 ± 5,9
1	183,1 ± 24,8
2	140,4 ± 27,5
3	45,5 ± 12,7
4	17,6 ± 3,5
5	-5,9
6	-9,7
7	0,1
8	-17,3
9	-14,4
10	-1,2

Tabelle 14: Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_2\delta$ Rezeptoren in % (vgl. Kapitel 2.5.1, Seite 32) durch die mittels VLC erhaltenen Fraktionen (vgl. Kapitel 2.3.3, Seite 28)

Die Fraktionen wurden auch hinsichtlich ihres Gehaltes an Sesquiterpensäuren mittels HPLC analysiert (siehe Kapitel 2.3.2, Seite 25). Dabei resultierte folgendes Ergebnis:

Sesquiterpensäuren waren nur in den ersten vier Fraktionen (100 % CH_2Cl_2) zu finden, wobei Fraktion 1 hauptsächlich Valerensäure, die anderen Fraktionen auch einen Gehalt an Acetoxyvalerensäure enthielten. In der Messlösung von Fraktion 1 (100 $\mu g/ml$) waren 16,75 μM Valerensäure und 1,72 μM Acetoxyvalerensäure enthalten (siehe auch Tabelle 15, Seite 58). Wie Abbildung 26, Seite 56 und Tabelle 14 zeigen, bewirkte Fraktion 1 von allen erhaltenen Fraktionen die stärkste Modulation von I_{GABA} (183,1 ± 24,8 %). Fraktion 2 zeigte eine Stimulation von 140,45 ± 27,5 %, die Konzentrationen von Valerensäure und Acetoxyvalerensäure in der Messlösung dieser Fraktion waren allerdings beträchtlich höher (47,87 μM VS und 39,85 μM AVS). In Fraktion 3 analysierten wir den höchsten Gehalt an Acetoxyvalerensäure. Die Messlösung dieser Fraktion hatte eine Konzentration von 3,83 μM Valerensäure und 48,39 μM . Der Modulationseffekt war mit 45,5 ± 12,7 % geringer als der von Fraktion 1 und 2. Zusammenfassend zeigte diese Korrelation von Modulation am $GABA_A$ -Rezeptor und Konzentration der Sesquiterpensäuren, dass jene Fraktion (1), die hauptsächlich Valerensäure enthielt, einen stärkeren stimulatorischen Effekt hatte als Fraktion 2, obwohl beide Verbindungen in dieser Messlösung in höherer Konzentration enthalten waren. Die Stimulation von I_{GABA} nahm in Fraktion 3 und 4 ab, genauso wie der Gehalt an Sesquiterpensäuren. Tabelle 15 (Seite 58) zeigt den Gehalt der beiden

Sesquiterpensäuren (Valerensäure und Acetoxyvalerensäure) im Extrakt bzw. in den Fraktionen 1 - 4 [%], die Konzentration in der Messlösung [μM] und die Modulation am GABA_A -Rezeptor-Modell [%]:

	VS [%]	VS [μM]	AVS [%]	AVS [μM]	Rezeptor-Modulation [%]
EA	3,11	13,29	3,85	13,17	57,77
Fraktion 1	3,91	16,75	0,51	1,72	183,12
Fraktion 2	11,20	47,87	11,65	39,85	140,45
Fraktion 3	0,90	3,83	14,26	48,39	45,52
Fraktion 4	0,96	4,10	1,64	5,60	17,61

Tabelle 15: Gehalt an VS und AVS im Ethylacetat-Extrakt (EA) und in den mittels VLC erhaltenen Fraktionen 1 – 4 (siehe Kapitel 2.3.3, Seite 28) in % und Konzentration in der Testlösung [μM] sowie Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren in % (vgl. Kapitel 2.5.1, Seite 31)

Diese Resultate bestätigten, dass apolare Extrakte bzw. Fraktionen aus *Valerianae radix*, die auch einen höheren Gehalt an Sesquiterpensäuren aufweisen, eine Stimulation des GABA -Stroms an GABA_A -Rezeptoren bewirken, polare Extrakte hingegen an diesem Rezeptor keine Wirkung zeigen.

Da auch eine Korrelation zwischen dem Gehalt an Sesquiterpensäuren, vor allem an Valerensäure, und der Modulation der Extrakte und Fraktionen am GABA_A -Rezeptor bestand, sollte dieses Ergebnis bestätigt werden. Dafür sollten die Sesquiterpensäuren – Valerensäure und Acetoxyvalerensäure – durch Bioassay-guided Fraktionierung weiter angereichert und isoliert werden, um durch Testung der Fraktionen und Reinsubstanzen am GABA_A -Rezeptor Modell deren Wirkung zu untersuchen.

3.1.5 Isolierung von Sesquiterpensäuren aus *Valerianae radix*

Aufgrund der bisher erhaltenen Ergebnisse bestand ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Valerensäure in Baldrianextrakten und der Modulation von I_{GABA} an GABA_A -Rezeptoren. Da es sich bei Pflanzenextrakten aber um Vielstoff-Gemische handelt, könnten auch andere apolare Verbindungen enthalten sein, die für die gemessene Wirkung am GABA_A -Rezeptor (mit)verantwortlich sind. Daher war es nötig, die Sesquiterpensäuren als Reinsubstanzen darzustellen, um deren Modulation des GABA_A -Rezeptors zu messen.

Ausgegangen wurde von dem Ethylacetat-Extrakt (EA), da das DEV hoch war, und auch die Sesquiterpensäuren zu einem hohen Anteil enthalten waren (siehe Tabelle 6, Seite 40).

Im ersten Schritt wurden 500 g pulverisierte Droge, wie in Kapitel 2.2.2, Seite 22 beschrieben, mit Ethylacetat extrahiert und 7,5 g EA-Extrakt hergestellt (DEV 67:1).

Zur Anreicherung der Sesquiterpensäuren wurde einerseits Flüssig/Flüssig-Verteilung und in einem zweiten Schritt Festphasenextraktion an NH₂-Kartuschen angewendet.

3.1.5.1 Flüssig/Flüssig-Verteilung

Hierbei wurde die Säurefunktion der Moleküle ausgenutzt. Durch Zugabe von KOH zu der methanolischen Lösung des Extraktes (siehe Kapitel 2.2.2, Seite 22) bildeten die Sesquiterpensäuren Salze, was zur Folge hatte, dass die Verbindungen beim Ausschütteln mit CH₂Cl₂ in der wässrig/methanolischen Phase gelöst waren, während organische Begleitstoffe in der Dichlormethan-Phase gelöst waren und so abgetrennt werden konnten. Die Dichlormethan-Fraktion wurde als Fraktion EA I bezeichnet. Danach wurde die wässrig-methanolische Phase mit HCl_{konz} angesäuert (pH 1), um die Säuren zu erhalten und durch nochmaliges Ausschütteln mit CH₂Cl₂ in der organischen Phase anzureichern (Fraktion EA II). In der folgenden Tabelle 16 sind Gewicht der beiden Fraktionen EA I und EA II [g] und der Gehalt der angereicherten Sesquiterpensäuren (STS) [%] in EA II angeführt:

Fraktion	Gewicht [g]	Gehalt an STS [%]
EA I	4,76128	--
EA II	1,44709	21,40*

* Summe des Gehalts der Sesquiterpensäuren

Tabelle 16: Gewicht [g] und Gehalt an STS [%] der beiden Fraktionen EA I und EA II, die mittels Flüssig/Flüssig-Verteilung aus dem Ethylacetat-Extrakt EA gewonnen wurden (siehe Kapitel 2.2.2, Seite 22)

Die beiden Fraktionen, EA I und EA II, wurden mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC untersucht, eine Anreicherung der Sesquiterpensäuren in EA II konnte bestätigt werden. Allerdings waren in Fraktion EA II hauptsächlich Valerensäure und Hydroxyvalerensäure enthalten, Acetoxyvalerensäure wurde demnach hydrolysiert und in Hydroxyvalerensäure umgewandelt.

Abbildung 27 - Abbildung 29 (Seite 60) zeigen die HPLC-Chromatogramme des Extraktes EA und der beiden erhaltenen Fraktionen EA I und EA II:

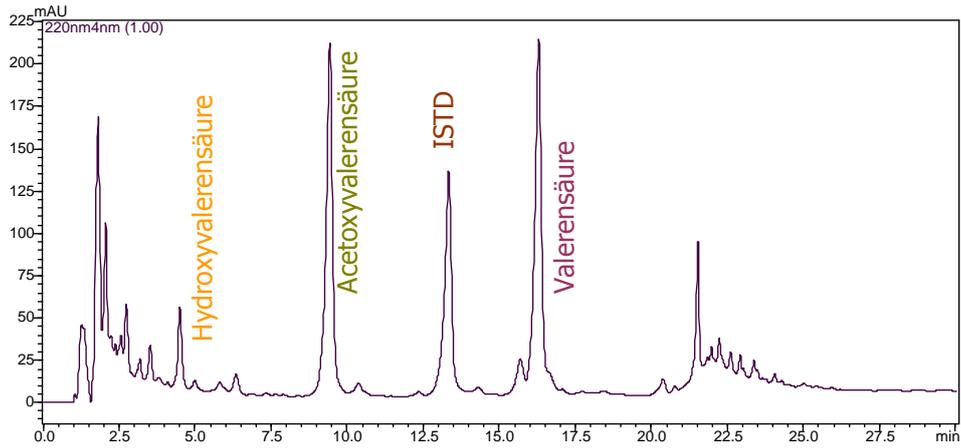


Abbildung 27: HPLC-Analyse des Ethylacetat-Extrakts (EA), Dantron als interner Standard (ISTD)
HPLC-Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25

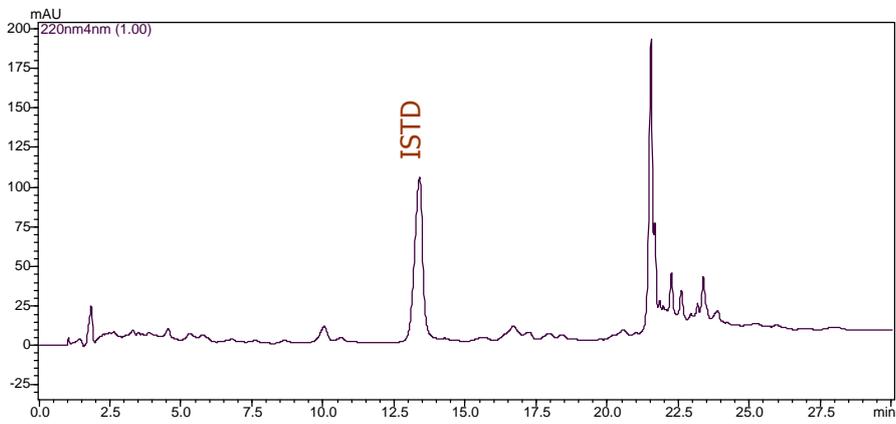


Abbildung 28: HPLC-Chromatogramm der Fraktion EA I (siehe Seite 59), ISTD = interner Standard
Dantron, HPLC-Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25

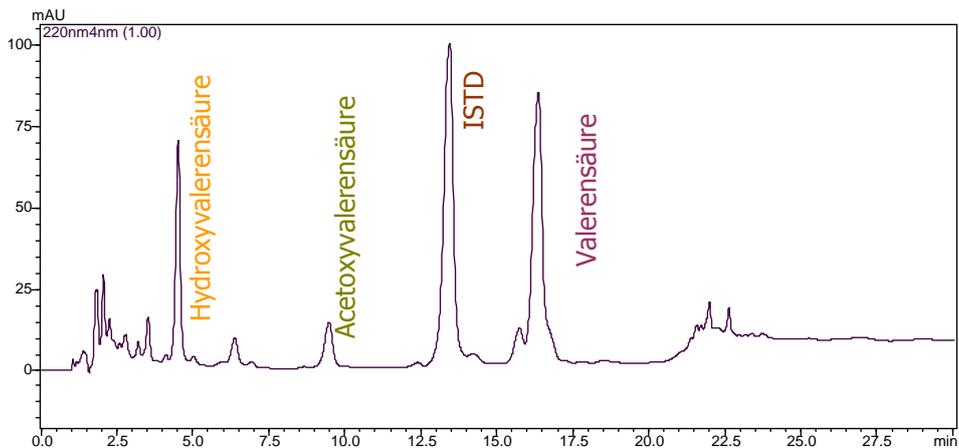


Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm der Fraktion EA II (siehe Seite 59), ISTD = interner Standard
Dantron, HPLC-Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25,

Die beiden Fraktionen EA I und EA II wurden hinsichtlich Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_2\delta$ Rezeptoren untersucht: Wie Abbildung 30 veranschaulicht, bewirkte EA I keine Verstärkung des GABA-induzierten Cl^- -Stroms, während EA II zu einer Stimulation von $149,2 \pm 29,1$ % führte. Beide Fraktionen wurden in einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ appliziert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine Stimulation von I_{GABA} durch Sesquiterpensäuren erfolgt, da nach Anreicherung der Substanzen durch Flüssig/Flüssig-Verteilung in Fraktion EA II (21,4 %), diese eine stark modulatorische Wirkung zeigte, wohingegen durch Fraktion EA I, die keine Sesquiterpensäuren enthielt, auch keine Stimulation von I_{GABA} gemessen werden konnte.

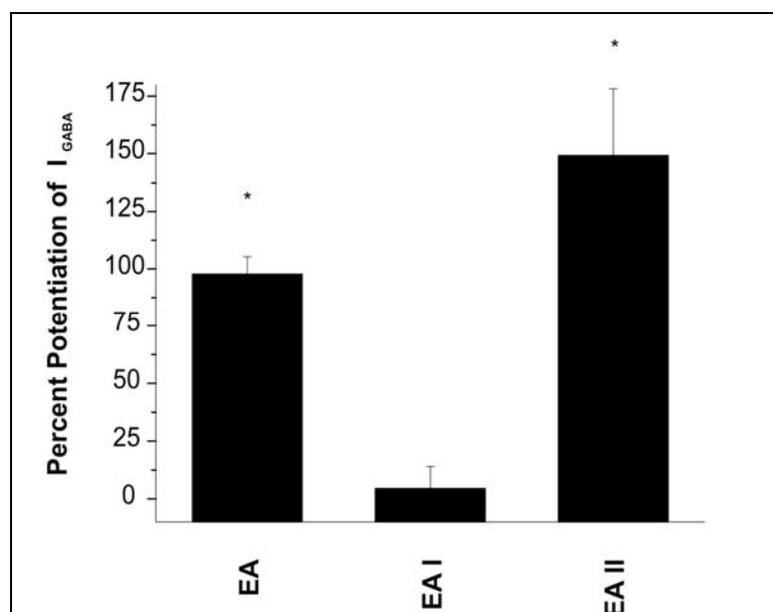


Abbildung 30: Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_2\delta$ Rezeptoren (vgl. Kapitel 2.5.1, Seite 32) des Extraktes EA sowie der Fraktionen EA I und EA II nach der Abtrennung der STS (siehe Seite 59) vom Ethylacetat-Extrakt EA (siehe Kapitel 2.2.2, Seite 22)

EA I = Fraktion ohne STS, EA II = Fraktion mit STS; Testkonzentration: $100 \mu\text{g}$ Extrakt/ml

(*) zeigt Werte signifikant unterschiedlich zu Null an ($p < 0,05$, t-test by ANOVA)

Da in EA II neben Valerensäure und Hydroxyvalerensäure auch andere Substanzen enthalten waren, die eventuell für die Stimulation am $GABA_A$ -Rezeptor verantwortlich sein könnten, war es nötig, die Sesquiterpensäuren weiter anzureichern, und eine Reindarstellung zu ermöglichen.

3.1.5.2 Festphasen-Extraktion an NH_2 -Kartuschen

Als weiterer Schritt zur Anreicherung und Aufreinigung der Sesquiterpensäuren sowie zur Abtrennung von ionischen Begleitstoffen wurde die Festphasenextraktion an NH_2 -Kartuschen gewählt. Wie beschrieben (Kapitel 2.2.2, Seite 22) wurden die NH_2 -Kartuschen konditioniert

und anschließend die aufgebrauchte Probelösung eluiert. In drei Ansätzen wurden insgesamt 1,4 g EA II in 12,00 ml MeOH gelöst, aufgebracht und durch Elution mit MeOH und anschließend mit MeOH/HCl_{konz} in zwei Fraktionen aufgetrennt (siehe Kapitel 2.2.2, Seite 22). Die beiden Fraktionen wurden separat gesammelt und am Rotavapor unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht. Mittels DC wurde die Anreicherung der Sesquiterpensäuren in der sauren MeOH-Fraktion bestätigt (siehe Abbildung 31). Die MeOH-Fraktion wurde nach DC-Kontrolle verworfen, da sie keine Sesquiterpensäuren enthielt. Es resultierten 601 mg saure MeOH-Fraktion (EA II SF).

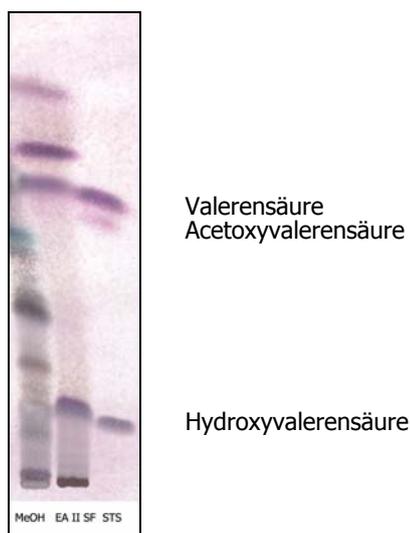


Abbildung 31: DC Chromatogramm der Fraktionen, erhalten durch SPE an NH₂-Kartuschen (siehe Kapitel 2.2.2, Seite 22), Bedingungen siehe Kapitel 2.3.1, Seite 24 (mobile Phase: CHCl₃:MeOH:H₂O (80:10:1))

3.1.5.3 Säulenchromatographie

Um die saure MeOH-Fraktion EA II SF, die durch SPE erhalten wurde (vgl. auch Seite 61), in die einzelnen Sesquiterpensäuren aufzutrennen, wurde die Säulenchromatographie an Kieselgel angewendet. Wir entschieden uns für diese Methode, da das DC-Chromatogramm der Fraktion eine gute Auftrennung der Substanzen zeigte (vgl. Abbildung 32, Seite 63). Zur Wahl des passenden Fließmittelsystems für die Elution wurden unterschiedlichen Mischungen von CHCl₃:MeOH:H₂O-Systemen mittels DC getestet.

Dabei zeigte sich bei dem Verhältnis $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (90:3,5:0,20) das beste Ergebnis:

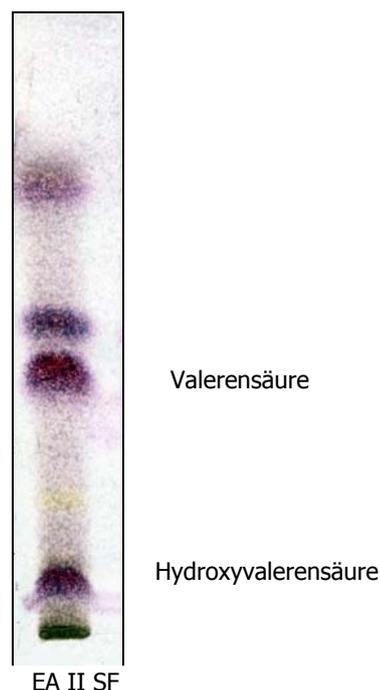


Abbildung 32: DC-Chromatogramm der Fraktion EA II SF (siehe Kapitel 2.2.2, Seite 22)
Bedingungen siehe Kapitel 2.3.1, Seite 24 (mobile Phase: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (90:3,5:0,20))

Da sich dieses Fließmittelsystem für die Dünnschichtchromatographie gut bewährt hatte, musste nun für die Säulenchromatographie die Polarität etwas verringert werden, um eine annähernd gleiche Trennung zu erzielen. Daher diente als mobile Phase die $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ -Mischung im Verhältnis 95:1,5:0,10 (siehe Kapitel 2.3.4.1, Seite 29). Es wurden 600 mg EA II SF in 4 ml MeOH gelöst, auf Kieselgel aufgezogen und nach Abdampfen des Lösungsmittels auf die mit Kieselgel gefüllte Säule aufgebracht (vgl. Kapitel 2.3.4.1, Seite 29). Danach wurde mit der Elution begonnen. Die Polarität des Elutionsmittels wurde im Laufe der Elution auf die $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ -Mischungen in den Zusammensetzungen 80:10:1, 75:15:2 und 70:22:3,5 gesteigert. In Tabelle 17 (Seite 64) sind die mobilen Phasen während der Elution angegeben. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 3 ml/20 Minuten. Die Eluate wurden in einem Fraktionssammler aufgefangen, der Inhalt jeder fünften Epruvette wurde am Rotationsverdampfer eingedunstet und mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Epruvetten mit ähnlichem oder gleichem DC-Muster wurden vereinigt und fortlaufend nummeriert.

Insgesamt erhielten wir 11 Sammelfractionen, wobei in Fraktion 3 vorwiegend Valerensäure und in Fraktion 9 vorwiegend Hydroxyvalerensäure enthalten war (vgl. Abbildung 33, Seite 64).

Mobile Phase (CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O)	Einzelfractionen (EF)	Sammelfractionen	Gewicht [mg]
95:1,5:0,10	Einzelfraktion 1 - 85	F1	138,5
95:1,5:0,10	Einzelfraktion 86 - 109	F2	103,7
95:1,5:0,10	Einzelfraktion 110 - 130	F3	38,0
ab EF 135: 80:10:1	Einzelfraktion 131 - 144	F4	112,5
80:10:1	Einzelfraktion 145 - 175	F5	6,1
80:10:1	Einzelfraktion 176 - 185	F6	5,0
ab EF 480: 75:15:2	Einzelfraktion 186 - 614	F7	106,6
75:15:2	Einzelfraktion 615 - 619	F8	1,5
ab EF 640: 70:22:3,5	Einzelfraktion 620 - 650	F9	34,2
70:22:3,5	Einzelfraktion 651 - 665	F10	5,7
70:22:3,5	Einzelfraktion 666 - 800	F11	45,5
Gesamtgewicht			597,3

Tabelle 17: Auflistung und Gewicht der Sammelfractionen F1 – F11 gewonnen durch Säulenchromatographie aus EA II SF (Bedingungen siehe Kapitel 2.3.4.1, Seite 29)

Abbildung 33 zeigt das DC-Chromatogramm der Sammelfractionen F1 – F11:

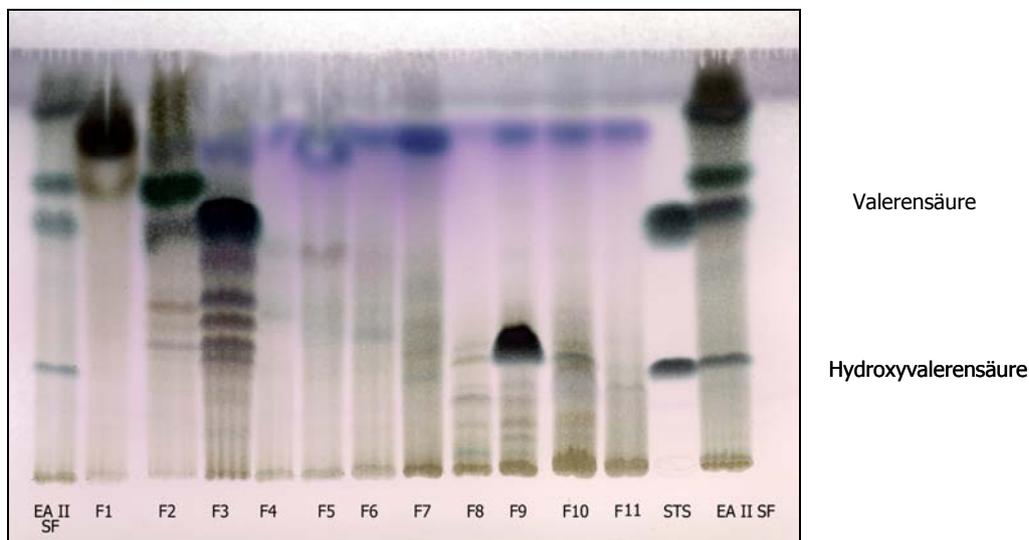


Abbildung 33: DC-Chromatogramm der Sammelfractionen erhalten durch Säulenchromatographie aus EA II SF (siehe Kapitel 2.3.4.1, Seite 29), STS = Sesquiterpensäuren
DC-Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.1, Seite 24 (mobile Phase: CHCl₃:MeOH:H₂O (90:3,5:0,20))

Die mittels Dünnschichtchromatographie in Fraktion 3 bzw. in Fraktion 9 nachgewiesene Valerensäure bzw. Hydroxyvalerensäure wurden mittels HPLC quantifiziert (Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25).

Der Gehalt an Valerensäure in Fraktion 3 betrug 5,5 %, 8,0 % Hydroxyvalerensäure waren in Fraktion 9 enthalten (vgl. Tabelle 18). Da die beiden Verbindungen nun schon stark angereichert in der jeweiligen Fraktion vorlagen, wurde im nächsten Schritt eine Reindarstellung angestrebt.

	Gehalt an STS	
	[%]	[mg]
Fraktion 3 (VS)	5,5	2,1
Fraktion 9 (HVS)	8,0	2,7

Tabelle 18: Gehalt an Sesquiterpensäuren (STS) der Sammelfraktionen 3 und 9 in [%] und [mg]

3.1.5.4 Isolierung der Valerensäure

Wie das DC-Chromatogramm der durch SC erhaltenen Fraktion 3 veranschaulicht (Abbildung 34), war Valerensäure in Fraktion 3 sehr stark angereichert.



Abbildung 34: DC-Chromatogramm der Sammelfraktion 3 (SF 3) (Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.1, Seite 24, mobile Phase: CHCl₃:MeOH:H₂O (90:3,5:0,20)); VS = Valerensäure

Da in früheren Isolierungsarbeiten der letzte Schritt der Reindarstellung durch Kristallisation erreicht wurde (Komarova et al. 2000), versuchten wir den dunkelgelben Rückstand in einer geringen Menge einer Mischung von Petrolether/Diethylether (1:1) in einer Kristallisierschale zu lösen. Nach Lagerung bei 4 °C fielen weiße Kristalle aus der Lösung aus. Diese wurden durch Abnutschen von der Mutterlauge getrennt und in der Trockenpistole getrocknet. Es konnten 1,8 mg Valerensäure isoliert werden. Der Schmelzpunkt betrug 135 – 138 °C und

stimmte mit den Daten der Literatur überein (Komarova et al. 2000). Die Identität wurde mittels DC, HPLC und UV-Spektrum bestätigt und zusätzlich mittels ^1H - und ^{13}C -NMR überprüft.

Abbildung 35 zeigt das DC-Chromatogramm der isolierten Valerensäure, der Mutterlauge und der käuflich erworbenen Vergleichssubstanz, mittels derer die Identität bestätigt wurde.

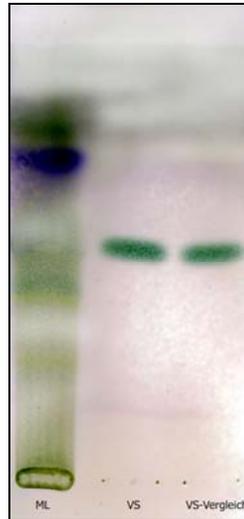


Abbildung 35: DC-Chromatogramm der isolierten Valerensäure (VS) (Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.1, Seite 24, mobile Phase: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (90:3,5:0,20)), ML = Mutterlauge

Für die Bestimmung der Reinheit mittels HPLC wurde eine 1 mM Lösung der Reinsubstanz in MeOH hergestellt und in einer Dreifachbestimmung jeweils 20 μl injiziert. Abbildung 36 zeigt das HPLC Chromatogramm der Valerensäure im Zuge der Reinheitsbestimmung, in dem keine nennenswerten zusätzlichen Substanzpeaks detektiert wurden. Es konnte eine Reinheit von 93,9 % erreicht werden.

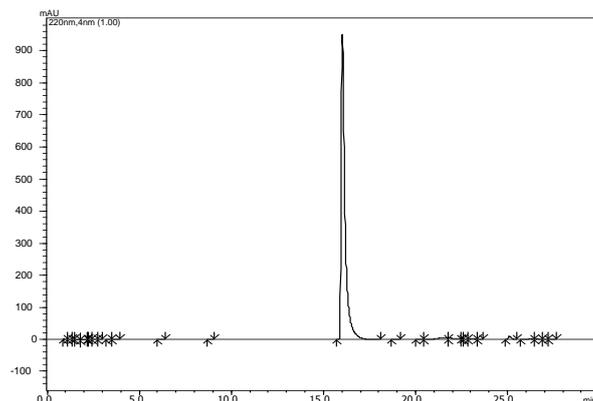


Abbildung 36: HPLC-Chromatogramm der Valerensäure (Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25)

Mittels Photo-Dioden-Array-Detektor wurde ein UV-Spektrum der Substanz aufgenommen. Es stimmte mit den Literaturdaten überein (Bos et al. 1996) und zeigte ein Maximum bei 217 nm (vgl. Abbildung 37, Seite 67).

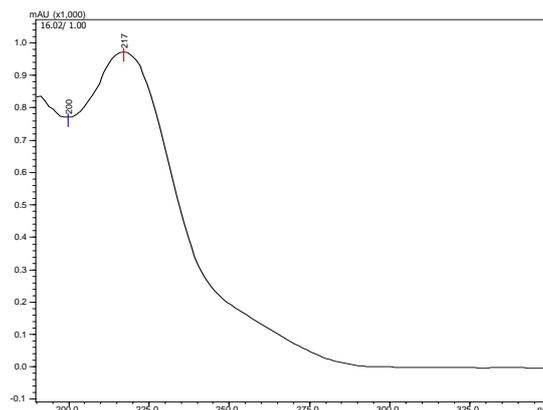


Abbildung 37: UV-Spektrum der Valerensäure (Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25)

Um die Identität zu bestätigen, wurden zusätzlich ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren der Verbindung mit einem 600 MHz Spektrometer in CDCl_3 aufgenommen (NMR-Parameter, vgl. Kapitel 2.4, Seite 30). Die Spektren befinden sich im Anhang. Die Struktur der Valerensäure wurde anhand der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten bestätigt und diese deckten sich mit den Daten der Literatur (Bos et al. 1986, Birnbaum et al. 1978, Dharmaratne et al. 2002). Im ^1H -Spektrum zeigt das Duplett von H_3 -15 bei $\delta = 0,781$ ppm ($J = 7,0$ Hz) die Methylgruppe an C-8, das Singulett von H_3 -10 beweist die Methylierung am quartären C-3. Bei $\delta = 1,891$ ppm ist im ^1H -NMR-Spektrum ein Singulett-Signal der Protonen an C-13 sichtbar. Auch das Triplet von H_2 -2 bei $\delta = 2,198$ ppm beweist diese CH_3 -Substitution. Bei $\delta = 7,153$ ppm ($J = 9,9$ Hz) ist ein Duplett von H-11 zu sehen. Das Protonensignal von H-9 zeigt bei $\delta = 2,94$ ein Multiplett-Signal (vgl. Abbildung I und II, Seite 119 und 120). Sowohl für dieses als auch für die Multiplettsignale der Protonen H_2 -1, H_2 -2, H_2 -6, H_2 -7 und H-8 konnten die Kopplungskonstanten nicht ausgemessen werden, da die Auflösung nicht ausreichte.

Im ^{13}C -NMR zeigt das Carboxyl-C (C-14) ein Signal bei $\delta = 172,78$ ppm. Die drei quartären C-Atome C-3, C-4 und C-12 konnten den Resonanzen bei $\delta = 131,21$ ppm (C-3), $\delta = 133,06$ ppm (C-4) und $\delta = 124,97$ ppm (C-12) zugeordnet werden (siehe Abbildung III, Seite 121 und Tabelle 19, Seite 68). Auch die Signal-Daten der primären, sekundären und tertiären C-Atome konnten zugeordnet werden und stimmten mit den Daten der Literatur überein (Bos et al. 1986, Birnbaum et al. 1978, Dharmaratne et al. 2002). In Tabelle 19 (Seite 68) sind die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Valerensäure aufgelistet.

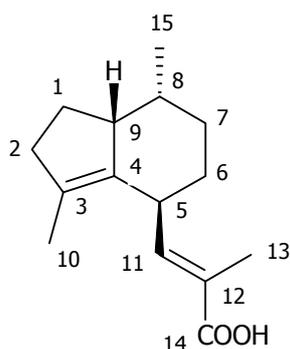


Abbildung 38: Strukturformel der Valerensäure

	Atom	δ (^{13}C) in ppm	δ (^1H) in ppm
1	CH ₂	24,50	1,840 m; 1,552 m
2	CH ₂	37,42	2,198 m
3	C _q	131,21	--
4	C _q	133,06	--
5	CH	34,53	3,542 d (J = 9,9 Hz; 5,0 Hz)
6	CH ₂	25,32	1,769 m; 1,410 m
7	CH ₂	28,72	1,847 m; 1,427 m
8	CH	33,00	1,992 m
9	CH	47,39	2,945 m
10	CH ₃	13,5	1,634 s
11	CH	146,13	7,153 d (J = 9,9 Hz)
12	C _q	124,97	--
13	CH ₃	12,04	1,891 s
14	C _q	172,78	--
15	CH ₃	12,04	0,781 d (J = 7,0 Hz)

Tabelle 19: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten der Valerensäure (Bedingungen vgl. Kapitel 2.4, Seite 30)

3.1.5.5 Isolierung der Hydroxyvalerensäure

In Fraktion 9 der SC (siehe Seite 62) war Hydroxyvalerensäure angereichert. Da mittels HPLC eine gute Trennung der Substanz von den anderen Komponenten der Fraktion erreicht wurde, setzten wir diese Methode für die Isolierung ein.

Die Fraktion (34,2 mg) wurde in 3,00 ml MeOH gelöst und mittels Autosampler wurden jeweils 40 μl auf die Säule injiziert (siehe Kapitel 2.3.2, Seite 25). Die Retentionszeit der Hydroxyvalerensäure lag zwischen 15,0 und 17,5 Minuten (siehe Abbildung 39, Seite 69), das Eluat wurde in einem Erlenmeyerkolben gesammelt und unter verminderten Druck zur

Trockene gebracht. Der Vor- und Nachlauf wurden vereinigt und nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle verworfen.

Abbildung 39 zeigt das HPLC-Chromatogramm der Sammelfraktion 9:

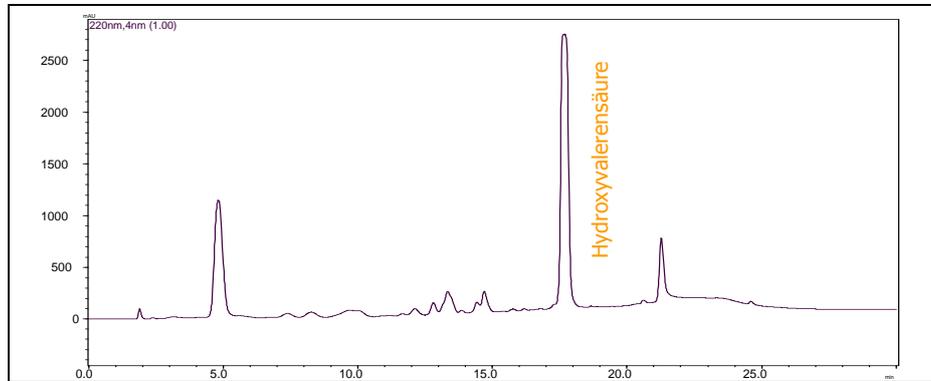


Abbildung 39: HPLC-Chromatogramm der Fraktion 9 (Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25)

Es konnten 2,5 mg Hydroxyvalerensäure isoliert werden, der Schmelzpunkt betrug 165 – 168 °C und entsprach dem der Literatur (Stoll und Seebeck 1956). Die Identität wurde mittels DC, HPLC und UV-Spektrum bestätigt und zusätzlich mittels ^1H - und ^{13}C -NMR überprüft. Abbildung 40 zeigt das DC-Chromatogramm der isolierten Verbindung sowie die vereinigten Vor- und Nachläufe (F9). Als Vergleichssubstanz diente käuflich erworbene Hydroxyvalerensäure.

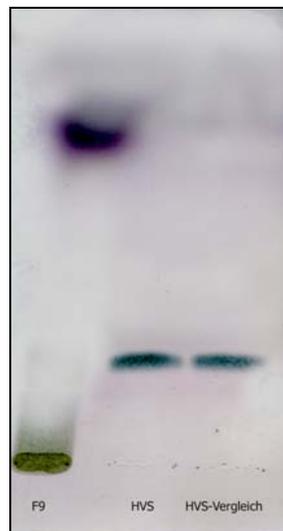
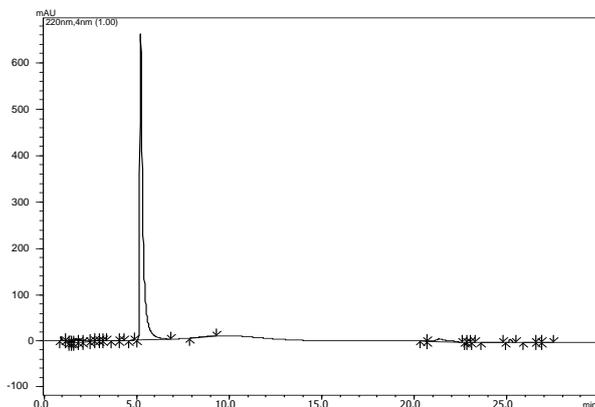


Abbildung 40: DC-Chromatogramm der isolierten Hydroxyvalerensäure (Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.1, Seite 24, mobile Phase: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (70:22:3,5))

Um die Reinheit zu bestimmen, wurde eine 1 mM Lösung der Substanz in MeOH hergestellt und in einer Dreifachbestimmung mittels HPLC analysiert (vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25). Es gelang Hydroxyvalerensäure mit einer Reinheit von 87,6 % anzureichern.



**Abbildung 41: HPLC-Chromatogramm der Hydroxyvalerensäure
(Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, S. 25)**

Das in Abbildung 42 dargestellte UV-Spektrum bestätigte ebenfalls die Identität und zeigte ein Maximum bei 218 nm. Es entspricht den Daten der Literatur (Bos et al. 1996).

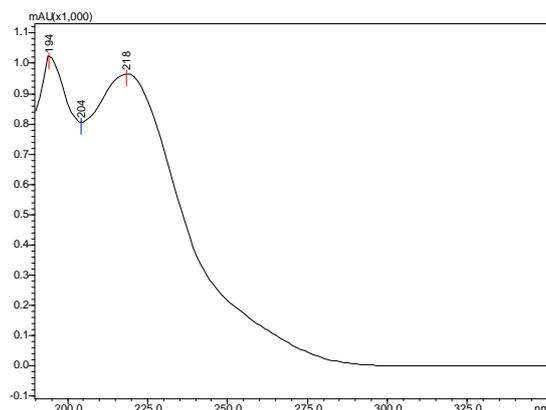


Abbildung 42: UV-Spektrum der Hydroxyvalerensäure (Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25)

Die Auswertung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren resultierte in einer zusätzlichen Bestätigung der Identität. Die Spektren befinden sich im Anhang. Die Daten wurden durch die der Literatur bestätigt (Bos et al. 1986, Birnbaum et al. 1978). Das Signal bei $\delta = 4,168$ ppm im ^1H -NMR Spektrum (vgl. Abbildung IV und V, Seite 122 und 123) beweist die Hydroxylierung an C-1. Auch im ^{13}C -NMR Spektrum konnte diese durch das Signal bei $\delta = 73,31$ ppm bestätigt werden (siehe Abbildung VI, Seite 124).

In Tabelle 20 (Seite 71) sind die Daten der ^1H - und ^{13}C -NMR Messungen zusammengestellt.

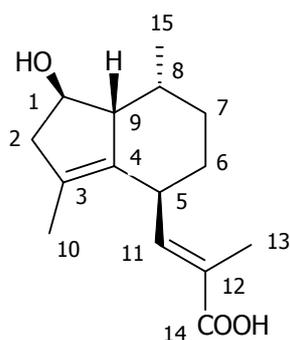


Abbildung 43: Strukturformel der Hydroxyvalerensäure

	Atom	δ (^{13}C) in ppm	δ (^1H) in ppm
1	CH	73,31	4,168 d (J = 2,47 Hz; 2,4 Hz; 7,0 Hz)
2	CH ₂	47,76	2,582 d (J = 7,0 Hz; 17,1 Hz; 1,0 Hz) 2,186 d (J = 17,1 Hz; 2,4 Hz; 1,0 Hz)
3	C _q	128,55	--
4	C _q	131,51	--
5	CH	34,26	3,550 d (J = 9,7 Hz; 5,1 Hz)
6	CH ₂	25,46	1,751 m (J = 3,5 Hz; 5,2 Hz; 13,4 Hz)
7	CH ₂	28,52	1,893 m; 1,420 m
8	CH	31,35	2,245 m
9	CH	57,68	2,758 m
10	CH ₃	13,45	1,666 s
11	CH	145,00	7,122 d (J = 9,7 Hz)
12	C _q	125,68	--
13	CH ₃	12,11	1,886 s
14	C _q	172,52	--
15	CH ₃	12,80	0,743 d (J = 7,0 Hz)

Tabelle 20: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten der Hydroxyvalerensäure (Bedingungen vgl. Kapitel 2.4, S. 30)

Wie diese Daten belegen, ist es gelungen, ausgehend von einer Bioassay-guided Fraktionierung am GABA_A-Rezeptor-Modell die beiden Sesquiterpensäuren Valerensäure und Hydroxyvalerensäure rein darzustellen. Der nächste Schritt sollte nun sein, die Reinsubstanzen hinsichtlich Modulation von I_{GABA} zu untersuchen und Dosis-Wirkungs-Beziehungen zu erstellen, um Information über deren Beitrag zur Wirkung von Baldrian-Extrakten zu erhalten.

3.1.6 Testung der Valerensäure und Hydroxyvalerensäure am GABA_A-Rezeptor

Nachdem die bisherigen Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Sesquiterpensäuren, vor allem an Valerensäure und der Stimulation des GABA_A-Rezeptors gezeigt hatten, wurden nun auch die isolierten Substanzen auf ihre Wirkung getestet.

Es wurden Dosis-Wirkungskurven der Valerensäure an verschiedenen Kombinationen der Untereinheiten des Rezeptors erstellt. Zuerst wurde die am häufigsten exprimierte Kombination - $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ - gewählt. Bei der γ -Untereinheit gibt es zwei verschiedene Splicevarianten 2S und 2L, die sich in der Anzahl der Aminosäuren unterscheiden.

Valerensäure wurde in den Konzentrationen 3, 10, 30, 100 und 300 μM gemeinsam mit 5 oder 10 μM GABA (entsprechend der EC_{5-10} an diesem Rezeptortyp) appliziert.

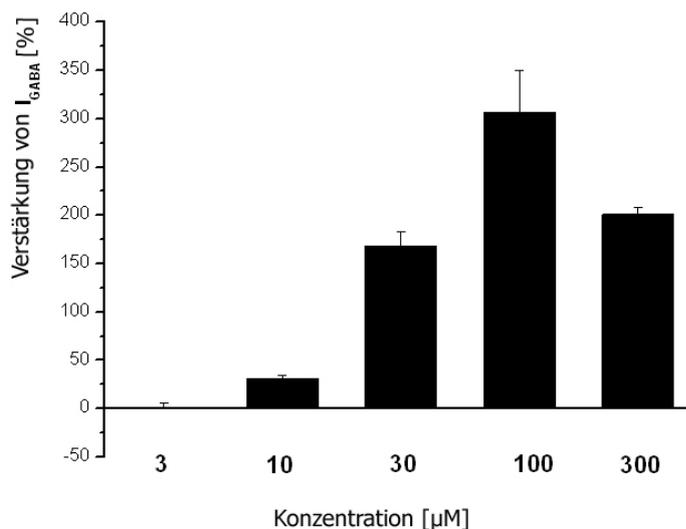


Abbildung 44: Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch Valerensäure
(siehe Kapitel 2.5.1, Seite 32)

Eine erste deutlich sichtbare Modulation des GABA-induzierten Cl^- -Stroms trat ab einer Konzentration von 10 μM auf. Die EC_{50} (= mittlere effektive Konzentration, diejenige Konzentration, bei der ein „halbmaximaler“ Effekt beobachtet wird) an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren lag bei 13,6 μM .

Die Substanz zeigte sowohl Affinität zu Rezeptoren mit α_1 -Untereinheiten als auch zu solchen, die α_2 -Untereinheiten enthielten. Um zu überprüfen, ob eine Interaktion mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle bestand, die sich zwischen der α - und der γ -Untereinheit

befindet (vgl. Abbildung 18, Seite 42 und Abbildung 19, Seite 43), wurden einerseits Rezeptoren exprimiert, bei denen die γ -Untereinheit fehlt, andererseits wurde Valerensäure gemeinsam mit dem Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil und gemeinsam mit Diazepam getestet. Alle Versuche brachten das Ergebnis, dass keine Interaktion mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle bestand (Khom et al. 2007).

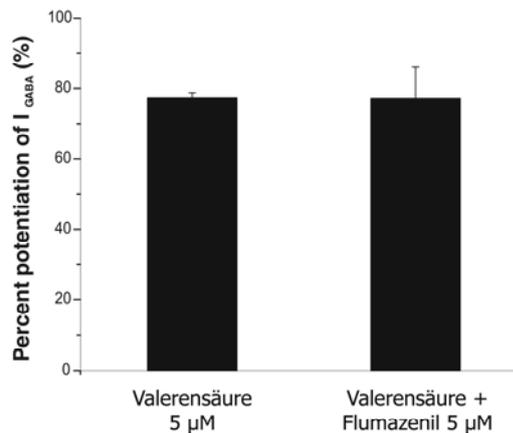


Abbildung 45: Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch Valerensäure 5 µM und durch Co-Applikation von Valerensäure + Flumazenil jeweils 5 µM (siehe Kapitel 2.5.1, Seite 32)

Wie Abbildung 45 veranschaulicht, kam es zu keiner Veränderung der gemessenen Stimulation der Valerensäure durch die gemeinsame Applikation mit Flumazenil. Bei Interaktion der Valerensäure mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle müsste der Zusatz von Flumazenil in einer verringerten Modulation resultieren. Zusätzlich wurde eine Verdrängungsreaktion durch Diazepam überprüft (siehe Abbildung 46, Seite 74). Bei der Co-Applikation von Valerensäure (10 µM) und Diazepam (300 nM) kam es zu einer Verstärkung der Stimulation von I_{GABA} , was ein weiterer Beweis dafür war, dass Valerensäure an eine andere Bindungsstelle angreift als Benzodiazepine.

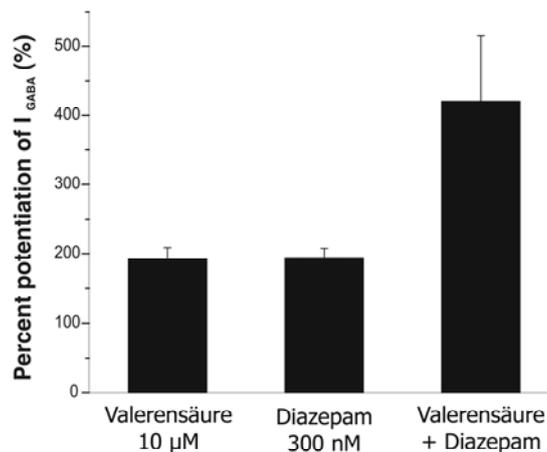


Abbildung 46: Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch Valerensäure 10 μ M, Diazepam 300 nM und durch Co-Applikation von Valerensäure 10 μ M + Diazepam 300 nM (siehe Kapitel 2.5.1, Seite 32ff.)

Die am häufigsten exprimierte Kombination der Untereinheiten des $GABA_A$ -Kanals stellt der $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptor dar. Durch Variation der injizierten cRNA (vgl. Kapitel 2.5.1.2, Seite 31) kann die Zusammensetzung der Untereinheiten bestimmt werden. Da sich die Bindungsstellen für Liganden des Rezeptors zwischen den Untereinheiten befinden (vgl. Seite 43ff.), kann durch Testung unterschiedlicher Kombinationen der verschiedenen Untereinheiten mehr Informationen zu dem Angriffsmechanismus einer Substanz erhalten werden.

Es wurden α_{1-5} - und β_{1-3} -Untereinheiten getestet. Dabei zeigte sich eine Affinität zu der β_2 - und der β_3 -Untereinheit, die β_1 -Untereinheit bewirkte eine geringere Modulation. Durch eine Punktmutation in der β_2 -Untereinheit (β_{2N265S}) konnte gezeigt werden, dass Valerensäure mit derselben Bindungsstelle wie das Anästhetikum Loreclezol interagiert und so die Modulation des GABA-Stroms bewirkt. Interessanterweise kam es in höheren Konzentrationen (300 μ M) zu einer Abnahme der Stimulation von I_{GABA} (siehe Abbildung 44, Seite 72). Es wird vermutet, dass es zu einer Blockade der offenen Pore des $GABA_A$ -Kanals kommt (Khom et al. 2007).

Acetoxyvalerensäure und Hydroxyvalerensäure wurden auch an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptor vermessen. Konzentrationen von 0,1 μ M – 300 μ M wurden gemeinsam mit 5 bzw. 10 μ M GABA appliziert, um die Modulation von I_{GABA} zu messen. Wie Abbildung 47 (Seite 75) veranschaulicht, zeigten die beiden Substanzen keine Modulation am $GABA_A$ -Rezeptor (Khom et al. 2007).

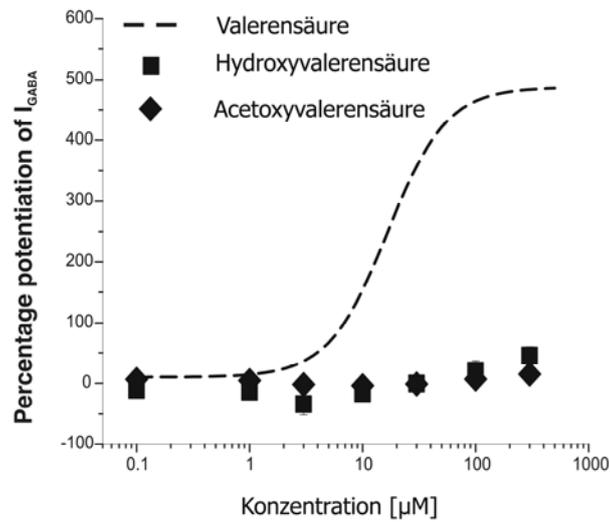


Abbildung 47: Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_2s$ Rezeptoren durch Valerensäure, Hydroxyvalerensäure und Acetoxyvalerensäure (Bedingungen vgl. Kapitel 2.5.1, Seite 32ff.)

Die Ergebnisse der Messung der Reinsubstanzen hinsichtlich Modulation des durch GABA ausgelösten Cl^- -Stroms am Rezeptor-Modell bestätigten die Ergebnisse der Stimulation durch Extrakte und Fraktionen. Wie sich durch die Anreicherung und Fraktionierung des Ethylacetat-Extrakts mittels VLC zeigte (vgl. Kapitel 3.1.4, Seite 55), bewirkten Fraktionen mit einem hohen Gehalt an Valerensäure eine stärkere Stimulation von I_{GABA} als Fraktionen, die zusätzlich auch Acetoxyvalerensäure enthielten (vgl. auch Tabelle 15, Seite 58).

3.2 Weiterführende Untersuchungen

3.2.1 Permeation der Sesquiterpensäuren durch ein Blut-Hirn-Schranken-Modell

Die „Blut-Hirn-Schranke“ (BHS) bezeichnet die Barriere zwischen dem peripheren Blutgefäßsystem und dem Zentralnervensystem. Sie setzt sich aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten zusammen. Die Endothelzellen formen einen dichten Zellverband, der durch Ausbildung so genannter „tight-junctions“ (Proteinkomplexe in den Membranen der Endothelzellen, „Zell-Zell-Verbindungen“) zustande kommt. Das „tight-junctions“-Netzwerk ist von großer Bedeutung für die Abdichtung des Endotheliums (Thews et al. 1999). Die Fähigkeit des Durchgangs durch die Blut-Hirn-Schranke ist für Substanzen, die im Zentralnervensystem wirken, essentiell. Neben dem passiven parazellulären und dem passiven transzellulären Transportweg sind auch diverse Transportproteine in der Membran lokalisiert, die Substanzen aktiv in das Zentralnervensystem transportieren (Thews et al. 1999). Um Information über die Permeabilität und den Transport von Verbindungen durch die Blut-Hirn-Schranke zu erhalten, wurden *in vitro*-Zellkultur-Modelle entwickelt, die einen guten Vergleich zur *in vivo* Situation bieten.

Da die Valerensäure als GABA_A-Modulator identifiziert wurde, dieser Rezeptor im ZNS lokalisiert ist und Liganden die Blut-Hirn-Schranke durchdringen müssen, um an diesen binden zu können, war es interessant Permeabilitätsdaten zu dieser Substanz und ihren Derivaten zu erhalten.

Für diese Untersuchungen wurde in Kooperation mit dem Department für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Wien ein etabliertes *in vitro* Modell, ein Transwell™ Modell, basierend auf *ECV304*-Zellen, eingesetzt (siehe Kapitel 2.6, Seite 35).

3.2.1.1 Optimierung des Versuchsaufbaus (in Hinblick auf Konzentration, Löslichkeit, Versuchsdauer)

Bei dem Transwell® Modell handelt es sich um eine Platte, bestehend aus 6 „Wells“, die mit Transportpuffer gefüllt sind, und einem „Filter-Insert“, in dem die Endothelzellen wachsen. Die zu untersuchende Substanz befindet sich in einer Puffer-Lösung im Insert. Während der Transportstudie wird das Insert in konstanten Zeitintervallen von einem Well in das nächste transferiert. Nach Beendigung des Versuchs werden die Lösungen der Wells und des Inserts mit Acetonitril versetzt, um die Proteine aus der Pufferlösung zu fällen, und danach hinsichtlich Konzentration der Substanz analysiert (vgl. auch Kapitel 2.6, Seite 35ff.). Zu

Beginn wurden für alle drei Sesquiterpensäuren die praktischen Nachweisgrenzen ermittelt sowie Konzentrationsgeraden erstellt, um die Linearität im gewählten Konzentrationsbereich festzustellen und um so eine geeignete Versuchskonzentration zu ermitteln. Es wurden jeweils sechs Lösungen unterschiedlicher Konzentration an Valerensäure, Acetoxyvalerensäure bzw. Hydroxyvalerensäure aus einer 1 mM Stammlösung in MeOH hergestellt: 1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM und 100 μM (in MeOH). Jede Lösung wurde mittels HPLC dreimal analysiert (vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25).

Die Konzentrationsgeraden (Abbildung 48 - Abbildung 50, Seite 78) zeigen Linearität in den gewählten Konzentrationsbereichen (1 μM – 100 μM):

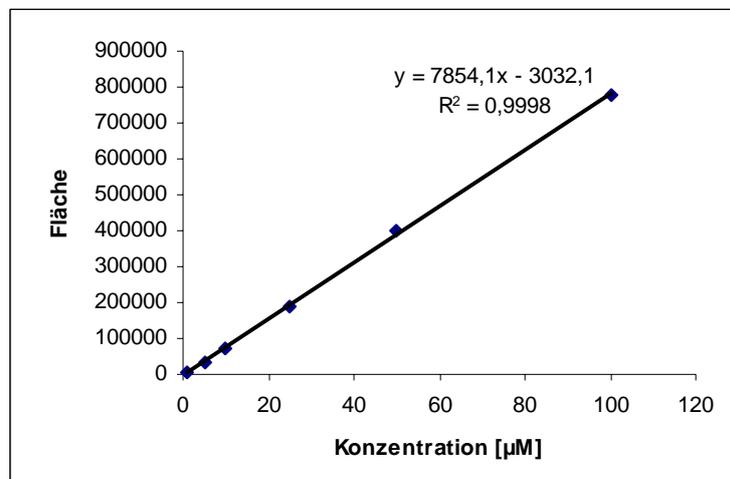


Abbildung 48: Konzentrationsgerade für Valerensäure (HPLC-Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, S. 25)

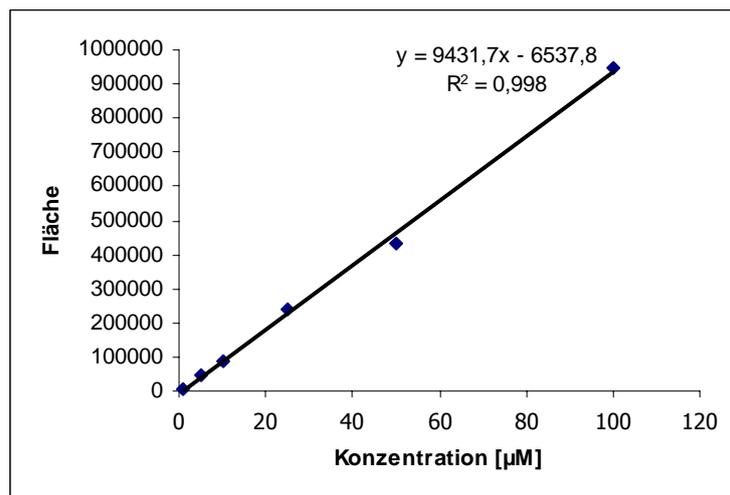


Abbildung 49: Konzentrationsgerade für Acetoxyvalerensäure (HPLC-Bedingungen vgl. Seite 25)

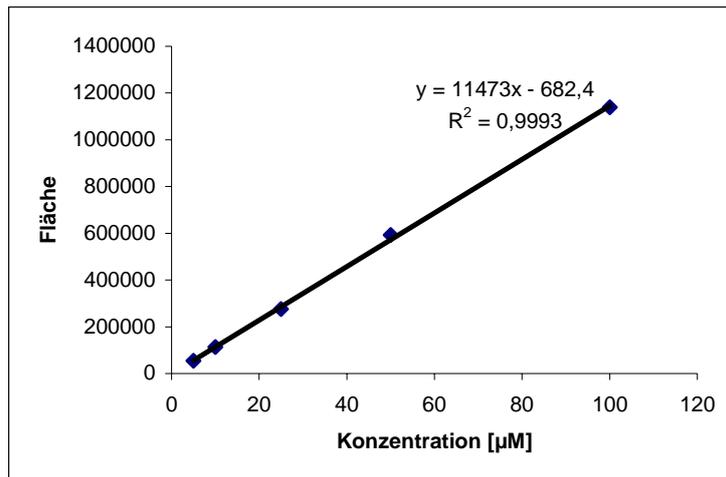


Abbildung 50: Konzentrationsgerade für Hydroxyvalerensäure (HPLC-Bedingungen vgl. Seite 25)

Für die Transportversuche wurde eine Konzentration von 100 µM gewählt, da die Substanzlösungen vor der HPLC-Analyse im Verhältnis 1:3 mit Acetonitril verdünnt werden mussten (siehe Kapitel 2.6, Seite 35ff.), um die Proteine aus der Pufferlösung zu fällen und die Konzentrationsgeraden Linearität in diesem Bereich zeigten. Es musste auch überprüft werden, ob Acetonitril (CH₃CN) für diese Fällung geeignet war. Wir entschieden uns für die Verwendung von Acetonitril, da es auch für die mobile Phase der HPLC verwendet wurde (vgl. Seite 25). Für jede Substanz wurden Verdünnungsreihen mit Proteinlösung (anstelle von MeOH) in den Konzentrationen 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM und 100 µM hergestellt. 500 µl dieser Lösung wurden mit 1,00 ml 4 °C kaltem CH₃CN versetzt, 30 Minuten bei 4 °C gelagert, zentrifugiert und anschließend mittels HPLC analysiert (siehe auch Kapitel 2.6, Seite 35). Jede Lösung wurde dreimal injiziert um Konzentrationsgeraden zu erstellen und die Linearität im gewählten Konzentrationsbereich sicherzustellen (siehe Abbildung 51 - Abbildung 53, Seite 79):

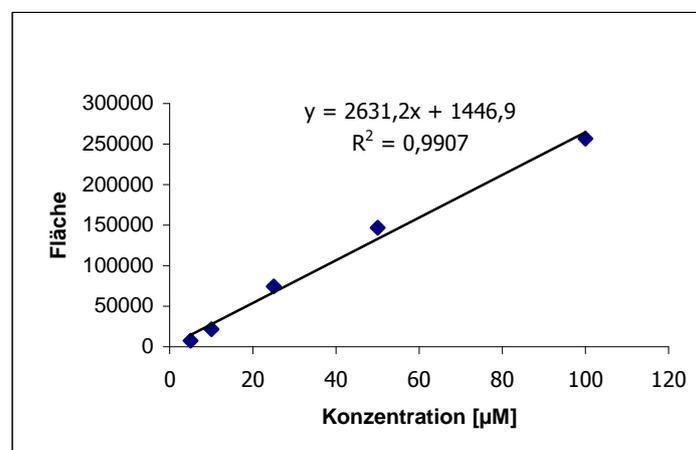


Abbildung 51: Konzentrationsgerade für Valerensäure nach Fällung der Proteine mit CH₃CN (siehe Kapitel 2.6, Seite 35), HPLC-Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25

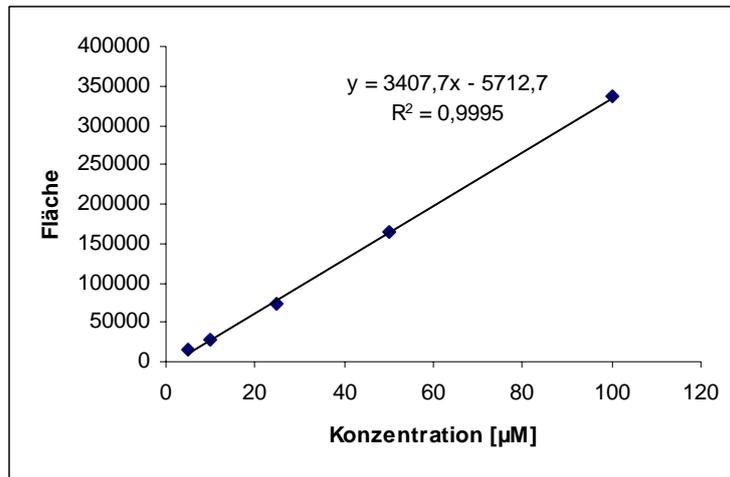


Abbildung 52: Konzentrationsgerade für Acetoxyvalerensäure nach Fällung der Proteine mit CH₃CN (siehe Kapitel 2.6, Seite 35), HPLC-Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25

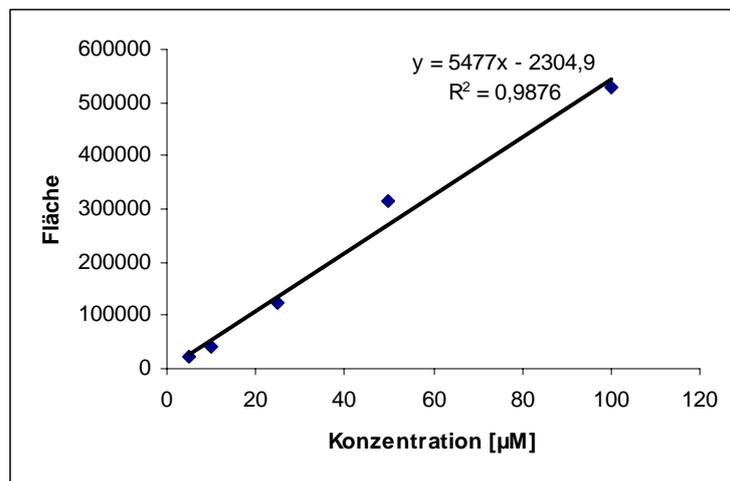


Abbildung 53: Konzentrationsgerade für Hydroxyvalerensäure nach Fällung der Proteine mit CH₃CN (siehe Kapitel 2.6, Seite 35), HPLC-Bedingungen vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25

Um Variabilitäten der Zellschicht während der Transportstudien auszugleichen, war ein interner Standard notwendig. Dafür diente Diazepam, da der Transportweg durch das BHS-Modell bekannt war – transzellulär, durch passive Diffusion (Neuhaus et al. 2006) – und es sich zusätzlich auch um eine GABA_A-modulierende Substanz handelte.

In Vorversuchen wurde getestet, welches Zeitintervall für ein Umsetzen der Wells optimal war. Fünf- und Zehn-Minuten-Intervalle waren nicht ausreichend um auswertbare Substanzkonzentrationen nach der Permeation zu erhalten, allerdings stellte sich heraus, dass ein Transfer der Inserts in ein neues Well in einem Zeitabstand von 20 Minuten ein optimales Intervall für diese Versuche war.

Es wurden sowohl Einzel-Transportstudien, wobei jede Komponente in einem eigenen Versuch in äquimolarer Konzentration mit Diazepam getestet wurde, als auch Gruppen-Transportstudien mit allen drei Substanzen zugleich durchgeführt.

Um die Permeabilität und auch die Dichtigkeit sowie die Ausbildung von „tight-junctions“ in der endothelialen Zellschicht zu messen, wird der transendotheliale Widerstand (TEER) bestimmt. Dabei wird im Zellmedium ein elektrisches Feld angelegt und die Barriere der Zellschicht gegen kleine Ionen (vor allem Na^+ und Cl^-) gemessen. Dieser ist auch ein Parameter für den parazellulären Transport von Substanzen durch die Zellschicht. Je höher der Widerstand, desto dichter ist der Zellrasen mit einer höheren Dichte an tight-junctions, was in einer geringeren parazellulären Transportrate resultiert.

Eine zweite wichtige Methode zur Kontrolle der Integrität des Zelllayers ist die mikroskopische Kontrolle während der Zellanzucht, die regelmäßig durchgeführt wurde.

3.2.1.2 Einzel-Transportstudien

Jede der drei Sesquiterpensäuren wurde zusammen mit Diazepam hinsichtlich Permeabilität des BHS-Modells untersucht. Als Transportparameter wurden die Clearance [μl] und der Permeabilitätskoeffizient [$\mu\text{m}/\text{min}$] berechnet (vgl. Seite 35).

Wie in Kapitel 2.6, Seite 35ff. beschrieben, wurden die Inserts, in denen die Zell-Monolayer gezüchtet wurden, in die 6-Well-Zellkultur-Platte umgesetzt. Jedes Well wurde mit 3,00 ml C6-Puffer-Medium befüllt. 2,00 ml einer Lösung, die jeweils eine der drei Sesquiterpensäuren sowie Diazepam in äquimolarer Konzentration von 100 μM enthielt, wurde in das Insert pipettiert. Im Abstand von 20 Minuten erfolgte der Transfer des Insert von einem Well zum folgenden. Nach 120 Minuten wurden die Lösungen der Wells, des Inserts und die Urprobe separat gesammelt. 500 μl jeder Lösung wurden mit 1,00 ml 4 °C kaltem Acetonitril versetzt und 30 Minuten bei 4 °C gelagert, um Proteine und Begleitstoffe auszufällen. Nach Zentrifugation wurden die Probelösungen in Dreifachbestimmungen mittels HPLC analysiert (vgl. Kapitel 2.3.2, Seite 25). Aus den erhaltenen Peakflächen konnten Clearance und Permeabilitätskoeffizient errechnet werden (vgl. Seite 35). Unter der Clearance versteht man die Menge an Substanzlösung, die pro Zeiteinheit die Zellschicht durchdringt. In Abbildung 55 - Abbildung 57, Seite 82) sind die Clearance vs. Zeit-Kurven der Einzel-Studien von Valerensäure, Acetoxyvalerensäure und Hydroxyvalerensäure dargestellt. Sie zeigen Linearität während der Versuche und lassen einen deutlichen Unterschied zwischen den Blindversuchen (durch leere Inserts) und den Zellversuchen durch mit Zell-Monolayer beschichtete Inserts erkennen. In jedem Diagramm sind die drei Zellwert- sowie die drei

Blindwert-Versuche dargestellt. Sie veranschaulichen die kontinuierliche Steigerung der permeierten Substanzmenge zu jedem gemessenen Zeitpunkt (alle 20 Minuten).

Ein deutlicher Unterschied zwischen den Kurven der einzelnen Substanzen und dem internen Standard Diazepam ist zu erkennen. Diazepam permeierte signifikant schneller durch das BHS-Modell (Abbildung 54).

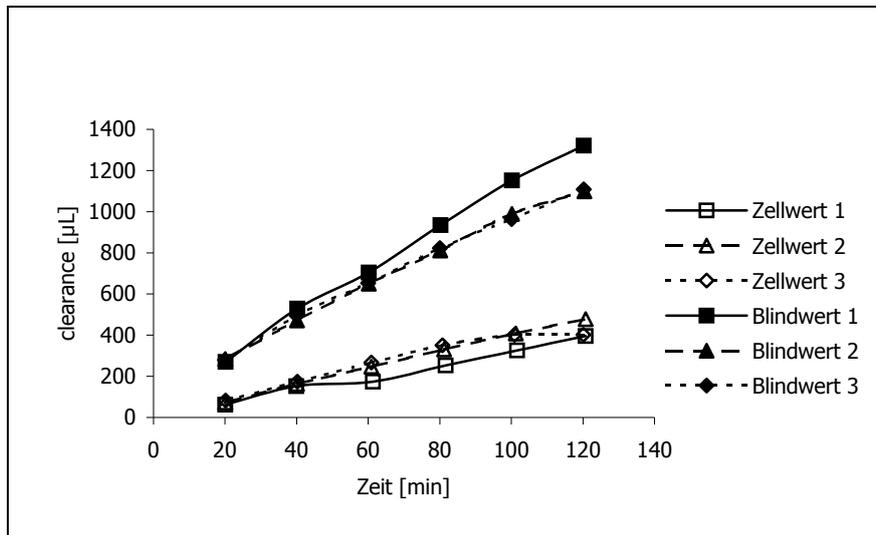


Abbildung 54: Clearance-Zeit-Diagramm für Diazepam (siehe Kapitel 2.6, Seite 35)

Zellwert = Transport durch *ECV304*-Monolayer; Blindwert = Transportversuch ohne Zellschicht

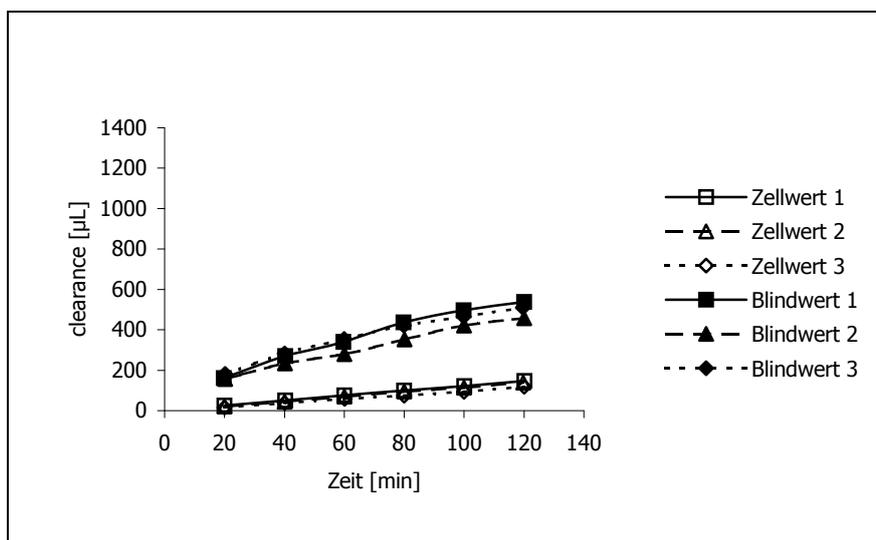


Abbildung 55: Clearance-Zeit-Diagramm für Valerensäure in der Einzel-Transportstudie (siehe Kapitel 2.6, Seite 35)

Zellwert = Transport durch *ECV304*-Monolayer; Blindwert = Transportversuch ohne Zellschicht

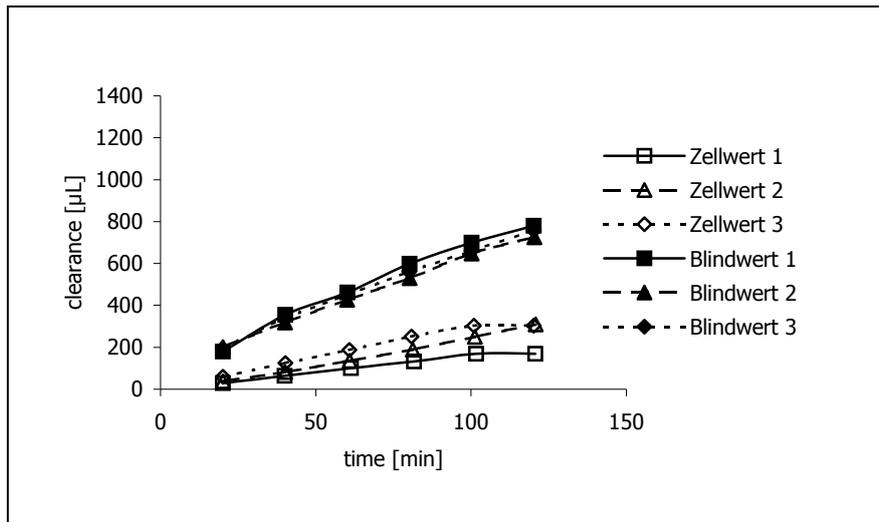


Abbildung 56: Clearance -Zeit-Diagramm für Acetoxyvalerensäure in der Einzel-Transportstudie (siehe Kapitel 2.6, Seite 35)

Zellwert = Transport durch ECV304-Monolayer; Blindwert = Transportversuch ohne Zellschicht

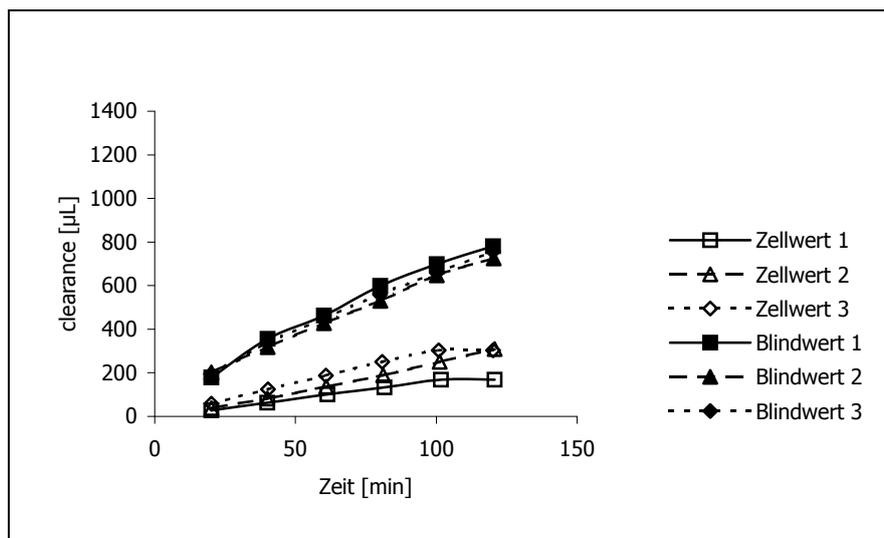


Abbildung 57: Clearance -Zeit-Diagramm für Hydroxyvalerensäure in der Einzel-Transportstudie (siehe Kapitel 2.6, Seite 35)

Zellwert = Transport durch ECV304-Monolayer; Blindwert = Transportversuch ohne Zellschicht

Als Transportparameter wurden weiters die Permeabilitätskoeffizienten (PE) aller untersuchten Substanzen berechnet (Berechnung siehe 35f.). Die Werte sind in Tabelle 21 (Seite 83) zusammengestellt. Auch die gemessenen TEER-Werte der Versuche sind angeführt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse und um Variabilitäten der Zellschichten auszugleichen, wurden die Blindwerte in die Berechnung der PE-Werte einbezogen. Um die einzelnen Versuche miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte auf den internen Standard Diazepam bezogen (PE_{standDA}). Alle angegebenen Werte

stellen Mittelwerte der drei Ansätze dar. Innerhalb der Sesquiterpene ergab sich folgende Reihenfolge: AVS zeigte, mit einem PE_{standDA} -Wert von $0,67 \pm 0,24 \mu\text{m}/\text{min}$, die schnellste Permeation (siehe auch Abbildung 56, Seite 82), gefolgt von HVS ($PE_{\text{standDA}} = 0,48 \pm 0,28$) und VS ($PE_{\text{standDA}} = 0,17 \pm 0,02$) bezogen auf Diazepam. Die Werte wurden zusätzlich auf Valerensäure bezogen (PE_{standVS}), um den Unterschied der Permeation zu Acetoxyvalerensäure ($PE_{\text{standVS}} = 4,05 \pm 1,73 \mu\text{m}/\text{min}$), Hydroxyvalerensäure ($PE_{\text{standVS}} = 2,93 \pm 1,89 \mu\text{m}/\text{min}$) und Diazepam ($PE_{\text{standVS}} = 5,97 \pm 0,60 \mu\text{m}/\text{min}$) besser zu verdeutlichen.

	PE [$\mu\text{m}/\text{min}$] \emptyset	PE_{standDA} \emptyset	PE_{standVS} \emptyset	TEER [$\text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$] \emptyset
HVS	$2,61 \pm 0,34$	$0,48 \pm 0,28$	$2,93 \pm 1,89$	$131,60 \pm 12,12$
DA	$7,22 \pm 4,75$	1,00	$5,97 \pm 0,60$	
AVS	$9,60 \pm 4,15$	$0,67 \pm 0,24$	$4,05 \pm 1,73$	$109,20 \pm 11,11$
DA	$14,03 \pm 2,95$	1,00	$5,97 \pm 0,60$	
VS	$4,10 \pm 0,64$	$0,17 \pm 0,02$	1,00	$126,00 \pm 21,55$
DA	$24,27 \pm 2,37$	1,00	$5,97 \pm 0,60$	

Tabelle 21: Permeabilitätskoeffizienten (PE) von Valerensäure (VS), Acetoxyvalerensäure (AVS), Hydroxyvalerensäure (HVS) und Diazepam (DA) und transendothelialer elektrischer Widerstand der Zellschicht (TEER) in den Einzel-Studien (siehe Kapitel 2.6, Seite 35)

Um eine mögliche Beeinflussung der Substanzen untereinander zu überprüfen und mehr Information über den Transportmechanismus zu erhalten, wurden alle drei Sesquiterpensäuren gemeinsam mit Diazepam in „Gruppen-Transportstudien“ hinsichtlich Permeation durch das BHS-Modell untersucht.

3.2.1.3 Gruppen-Transportstudien

Die drei Substanzen gemeinsam zu untersuchen, war aus folgenden Gründen wichtig:

Alle drei Säuren sind in *Valeriana officinalis* L. s.l. – wenn auch in unterschiedlichen Verhältnissen – enthalten, daher könnte es zu einer gegenseitigen Interaktion beim Transport kommen. Werden die Säuren beispielsweise durch einen Transporter in das Zentralnervensystem transportiert, könnten sie sich dabei gegenseitig verdrängen.

Zellvariabilitäten können ausgeschlossen werden, wenn alle drei Substanzen im selben Versuch (mit demselben Zell-Monolayer) vermessen werden.

Der Versuchsaufbau war der gleiche wie bei den Einzel-Transportstudien (siehe Seite 80), die vier Substanzen wurden gemeinsam in äquimolarer Konzentration ($100 \mu\text{M}$) in das Insertlumen pipettiert (2,00 ml).

Clearance und Permeabilitätskoeffizient wurden wiederum als Transportparameter berechnet. Abbildung 58 und Abbildung 59 zeigen die Clearance vs. Zeit-Diagramme der Gruppen-Transportstudie des internen Standards Diazepam und der drei Sesquiterpensäuren. Der Übersichtlichkeit halber wurden die Werte von Diazepam in einem eigenen Diagramm dargestellt (Abbildung 58). Alle Werte stellen Mittelwerte aus drei Zell- bzw. drei Blindwertversuchen dar.

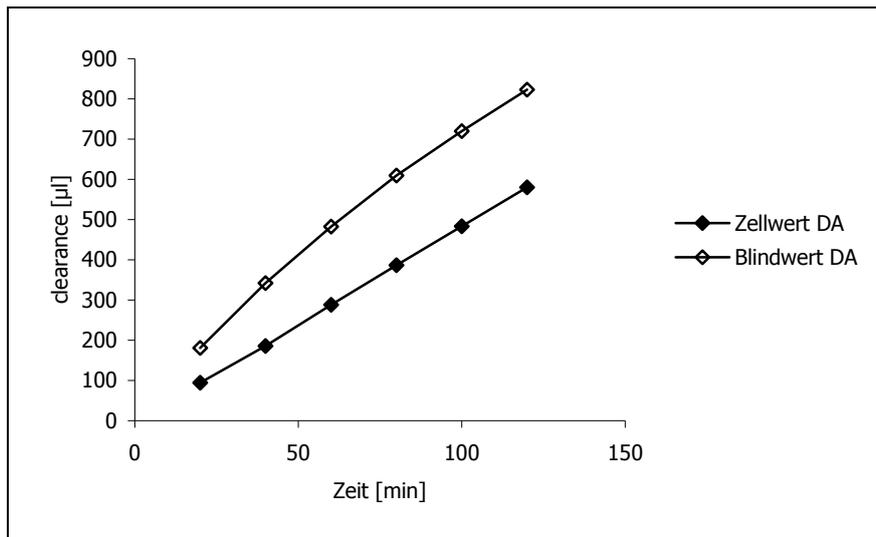


Abbildung 58: Clearance-Zeit-Diagramm für Diazepam (DA) in der Gruppen-Transportstudie (siehe Kapitel 2.6, Seite 35)

Zellwert = Transport durch *ECV304*-Monolayer; Blindwert = Transportversuch ohne Zellschicht

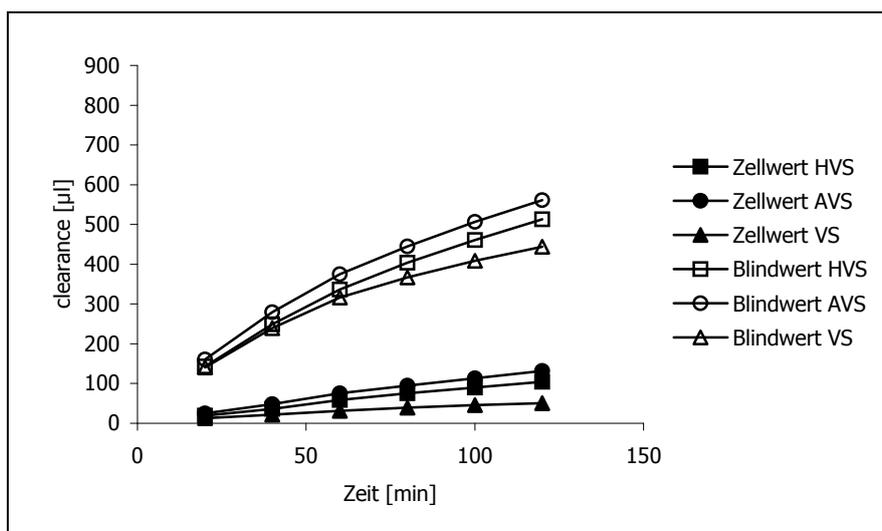


Abbildung 59: Clearance-Zeit-Diagramm für Valerensäure (VS), Acetoxyvalerensäure (AVS) und Hydroxyvalerensäure (HVS) in der Gruppen-Transportstudie (siehe Kapitel 2.6, Seite 35)

Zellwert = Transport durch *ECV304*-Monolayer; Blindwert = Transportversuch ohne Zellschicht

Die Clearance vs. Zeit-Diagramme der Gruppenstudie (Abbildung 58 und Abbildung 59, Seite 84) veranschaulichen das erhaltene Ergebnis: Alle drei Substanzen penetrierten deutlich langsamer als die Standardsubstanz Diazepam durch das Blut-Hirn-Schranken-Modell. Auch Tabelle 22 verdeutlicht dieses Ergebnis. Die Permeation gibt den prozentuellen Anteil der durch den *ECV304*-Monolayer penetrierten Substanz, bezogen auf die Konzentration der Substanz in der Urprobe, an. Die Zellwerte der drei Versuchsansätze sowie deren Mittelwert sind angeführt. Während 17 % Diazepam durch das BHS-Modell permeierten, liegt der Wert der Valerensäure nur bei 1,83 %. Für Acetoxyvalerensäure wurden 4,28 %, für Hydroxyvalerensäure 3,20 % berechnet. Die Reihenfolge der Permeation der drei Sesquiterpensäuren war also die gleiche wie bei den Einzelstudien (AVS > HVS > VS).

ZELLWERTE	Permeation HVS [%]	Permeation AVS [%]	Permeation VS [%]	Permeation DA [%]
1	3,40	4,85	2,78	12,98
2	3,29	4,13	1,48	18,40
3	2,92	3,87	1,24	19,84
Ø	3,20	4,28	1,83	17,07

Tabelle 22: Prozentueller Anteil der durch die *ECV304*-Zellschicht durchgegangenen Substanz während der Gruppenstudie (siehe Kapitel 2.6, Seite 35)

HVS = Hydroxyvalerensäure, AVS = Acetoxyvalerensäure, VS = Valerensäure, DA = Diazepam

Folgende Tabelle 23 zeigt die PE-Werte der Gruppenstudie (Berechnung der PE-Werte siehe Kapitel 2.6, Seite 35f.). Die Werte stellen Mittelwerte aus drei Ansätzen dar, Blindwerte wurden in die Berechnung einbezogen. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Werte wiederum einerseits auf den Standard Diazepam und andererseits auf die am langsamsten penetrierende Substanz Valerensäure bezogen.

	PE [$\mu\text{m}/\text{min}$] Ø	PE _{standDA} Ø	PE _{standVS} Ø	TEER [$\text{Ohm}\cdot\text{cm}^2$] Ø
HVS	2,72 ± 0,63	0,07 ± 0,09	2,58 ± 0,16	154,00 ± 27,33
AVS	3,54 ± 0,58	0,09 ± 0,10	3,41 ± 0,43	
VS	1,06 ± 0,30	0,03 ± 0,04	1,00	
DA	74,55 ± 49,86	1,00	82,24 ± 65,56	

Tabelle 23: Permeabilitätskoeffizienten von Valerensäure (VS), Acetoxyvalerensäure (AVS), Hydroxyvalerensäure (HVS) und Diazepam (DA) und transendothelialer elektrischer Widerstand der Zellschicht in der Gruppen-Studie (siehe Kapitel 2.6, Seite 35)

Die PE_{standVS} -Werte von Acetoxyvalerensäure ($3,41 \mu\text{m}/\text{min}$) und Hydroxyvalerensäure ($2,58 \mu\text{m}/\text{min}$) waren ähnlich wie jene der Einzelstudien, was vermuten lässt, dass sich die einzelnen Verbindungen beim Transport durch den *ECV304*-Zellmonolayer gegenseitig nicht beeinflussen. Zusätzlich waren die Standardabweichungen deutlich kleiner als bei den Einzelstudien, was eine bessere Reproduzierbarkeit von Gruppenstudien bewies. Allerdings lagen die PE_{standDA} -Werte deutlich unter jenen der Einzelstudien (AVS: $0,67 \mu\text{m}/\text{min}$ bzw. $0,09 \mu\text{m}/\text{min}$, HVS: $0,48 \mu\text{m}/\text{min}$ bzw. $0,07 \mu\text{m}/\text{min}$, VS: $0,17 \mu\text{m}/\text{min}$ bzw. $0,04 \mu\text{m}/\text{min}$). Der mit $154,00 \pm 27,33 \Omega \cdot \text{cm}^2$ gemessene TEER-Wert (vgl. Seite 35) war bei der Gruppenstudie höher als bei den Einzelstudien ($131,60 \pm 12,12 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $109,20 \pm 11,11 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $126,00 \pm 21,55 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (siehe Tabelle 21, Seite 83 und Tabelle 23, Seite 85). Der interne Standard Diazepam permeiert TEER-unabhängig (transzellulär, durch passive Diffusion) durch die Zellmembran (Neuhaus et al. 2006). Daher wurde eine Abhängigkeit des Transports der Sesquiterpensäuren vom transendothelialen Widerstand vermutet.

Es wurden zwei weitere Studien durchgeführt, bei denen Zellen nach vier bzw. sieben Tagen Zellanzucht verwendet wurden. Zu diesen Zeitpunkten bilden die Zellen zwar schon einen durchgehenden Zellrasen, die „tight-junctions“ sind aber geringer ausgebildet, als ab Tag vierzehn. Die Ausbildung der „tight-junctions“ und die Dichtigkeit der Zellschicht wurden neben Messung des transendothelialen Widerstands durch verschiedene mikroskopische Techniken (TEM, ESEM, SEM) kontrolliert (Neuhaus et al. 2008).

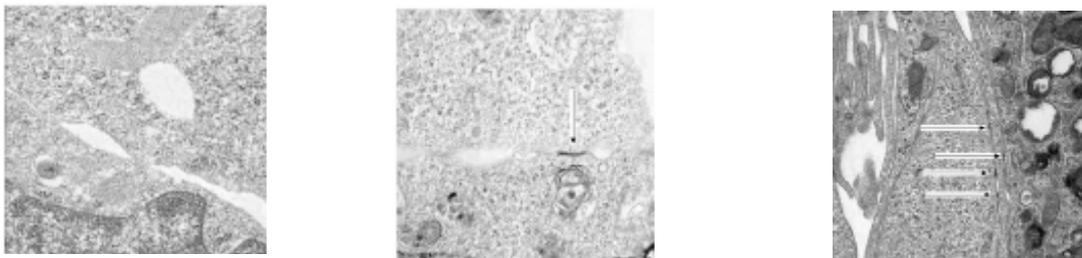


Abbildung 60: repräsentative Transmissionselektroskopie-Bilder der *ECV304*-Zellen an den Tagen 4 (links), 7 (Mitte) und 14 (rechts) der Zellanzucht (Neuhaus et al. 2008)

Die gemessenen TEER-Werte (vgl. Seite 35) lagen an Tag vier bei $65 \pm 12,12 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und an Tag sieben bei $105 \pm 19,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

Abbildung 61 (Seite 87) zeigt die gemessenen TEER-Werte im Verlauf einer Zellanzucht.

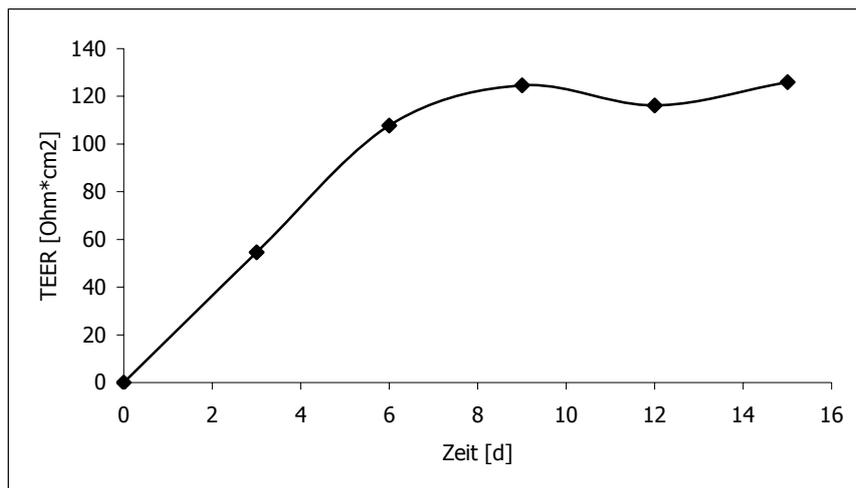


Abbildung 61: Verlauf der gemessenen TEER-Werte [Ohm*cm²] während der Zellanzucht für die Einzel-Transportstudie von Valerensäure (Werte repräsentieren Mittelwert von drei Zellschichten)

Die herkömmliche Dauer der Zellanzucht beträgt 13 – 16 Tage. Durch Messung des transendothelialen Widerstands (TEER) kann die Integrität der Zellschicht festgestellt werden. Abbildung 61 zeigt, dass nach 10 – 12 Tagen Zellanzucht Werte über 110 Ω*cm² erreicht werden können. Erst dann ist ein dichtes "tight-junctions"-Netzwerk ausgebildet.

Die TEER-abhängigen Transportstudien zeigten, dass die Sesquiterpensäuren bei geringeren TEER-Werten bedeutend schneller durch die Zellschichten permeierten. Die Clearance-Zeit-Diagramme veranschaulichen die gesteigerte Permeation der drei Sesquiterpensäuren nach vier (Abbildung 62, Seite 88) und nach sieben Tagen Zellanzucht (Abbildung 63, Seite 88). Die Versuche wurden jeweils in drei Ansätzen durchgeführt, sowohl Zell- als auch Blindwerte wurden bestimmt. Die Durchführung der Transport-Studien erfolgte analog der Gruppen-Studie nach vierzehn Tagen Zellanzucht (vgl. Seite 83).

Bei TEER-Werten von 65 Ω*cm² penetrierten größere Mengen der Sesquiterpensäuren durch die Zellschicht als bei den Versuchen mit 154 Ω*cm². Dies resultiert in einer größeren Steigung im Clearance vs. Zeit-Diagramm. Der Vergleich mit Abbildung 59 (Seite 84) verdeutlicht dieses Ergebnis. Auch nach sieben Tagen Zellanzucht (TEER = 105 Ω*cm²) ist die Permeabilität gesteigert. Die Reihenfolge der Substanzen blieb dieselbe wie in den früheren Transportstudien. Valerensäure zeigte die langsamste Permeation, gefolgt von Hydroxyvalerensäure und Acetoxyvalerensäure. Der Transport des internen Standards Diazepam blieb unverändert (siehe Abbildung 64, Seite 89).

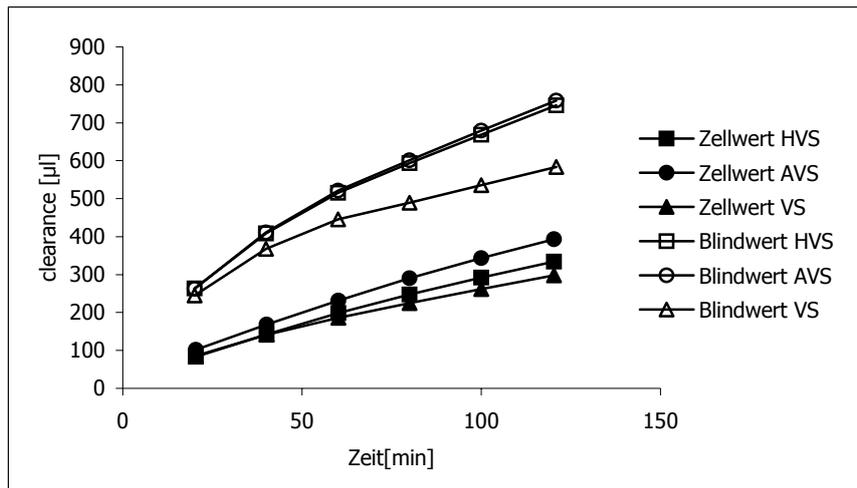


Abbildung 62: Clearance-Zeit-Diagramm für Valerensäure (VS), Acetoxyvalerensäure (AVS) und Hydroxyvalerensäure (HVS) in der TEER-abhängigen Gruppen-Transportstudie nach vier Tagen Zellanzucht (vgl. Kapitel 2.6, Seite 35)

Zellwert = Transport durch *ECV304*-Monolayer; Blindwert = Transportversuch ohne Zellschicht

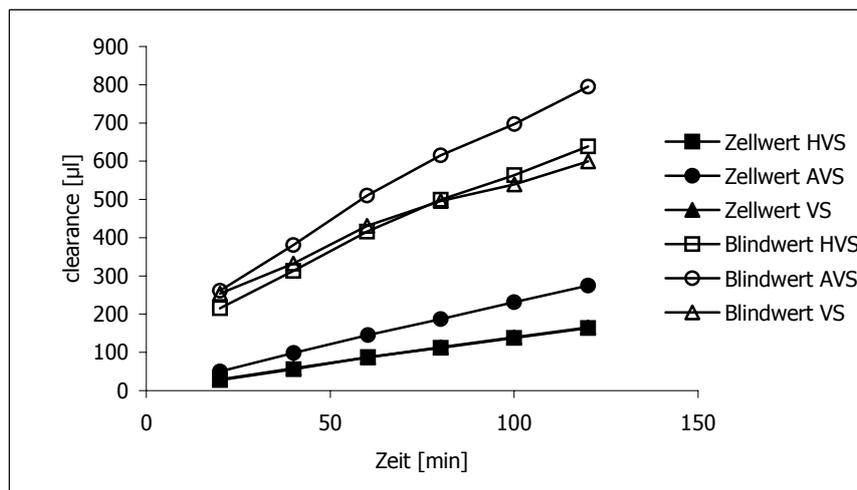


Abbildung 63: Clearance-Zeit-Diagramm für Valerensäure (VS), Acetoxyvalerensäure (AVS) und Hydroxyvalerensäure (HVS) in der TEER-abhängigen Gruppen-Transportstudie nach sieben Tagen Zellanzucht (siehe Kapitel 2.6, Seite 35)

Zellwert = Transport durch *ECV304*-Monolayer; Blindwert = Transportversuch ohne Zellschicht

Diazepam passiert den *ECV304*-Monolayer TEER-unabhängig (Neuhaus et al. 2006). Der Transportmechanismus der Substanz erfolgt transzellulär, durch passive Diffusion. Dies konnte auch in den TEER-abhängigen Gruppenstudien gezeigt werden. Während sich die Permeation der Sesquiterpensäuren steigerte, wurde bei Diazepam keine signifikante Veränderung, die in gesteigerten Clearance-Werten resultieren würde, beobachtet (siehe Abbildung 64, Seite 89).

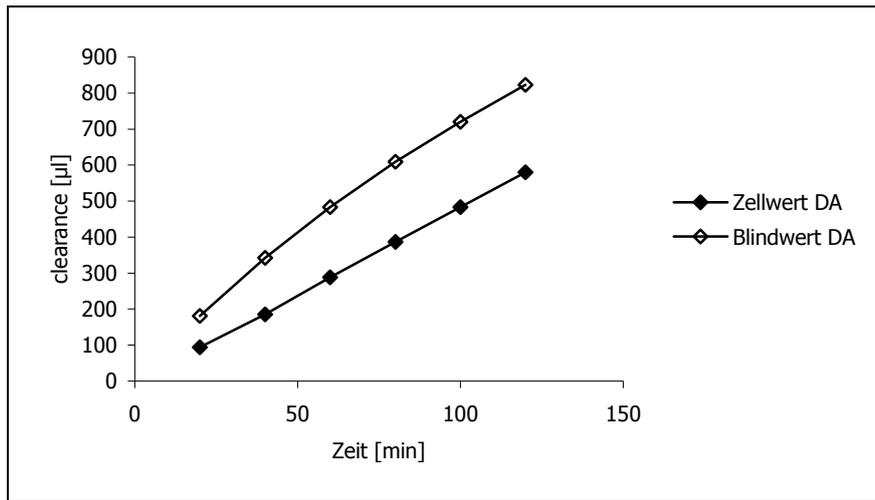


Abbildung 64: Clearance-Zeit-Diagramm für Diazepam (DA) in der TEER-abhängigen Gruppen-Transportstudie (siehe Kapitel 2.6, Seite 35) nach sieben Tagen Zellanzucht
 Zellwert = Transport durch *ECV304*-Monolayer; Blindwert = Transportversuch ohne Zellschicht

Im Gegensatz dazu war der Transport der Sesquiterpensäuren durch das BHS-Modell TEER-abhängig. In Abbildung 65 soll das Ergebnis am Beispiel der Valerensäure noch einmal veranschaulicht werden:

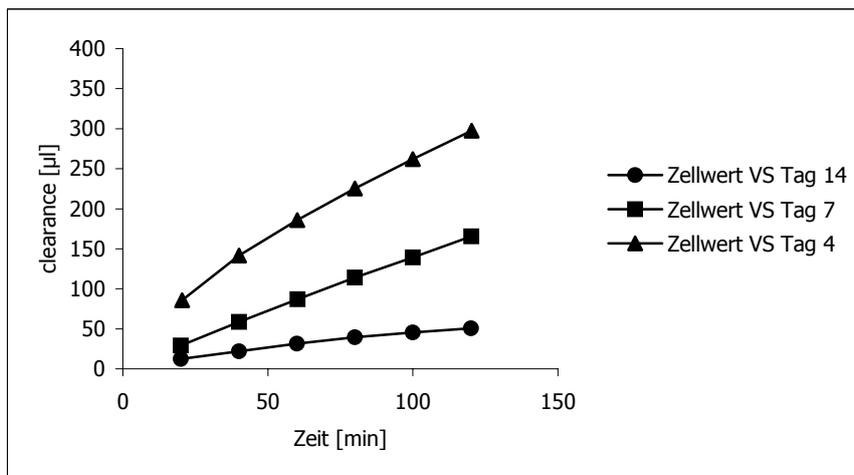


Abbildung 65: Clearance-Zeit-Diagramm für Valerensäure (VS) in den TEER-abhängigen Gruppen-Transportstudien (siehe Kapitel 2.6, Seite 35) nach vier, sieben und vierzehn Tagen Zellanzucht
 Zellwert = Transport durch *ECV304*-Monolayer

Durch die unterschiedlichen Steigungen der Clearance-Zeit-Kurven der drei Versuche (Abbildung 65) zeigt sich, dass nach vier Tagen Zellanzucht mehr Substanz während des Transportversuchs durch den *ECV304*-Monolayer permeierte, als nach nach sieben Tagen Zellanzucht. Nach vierzehn Tagen waren die Permeabilitäts-Werte deutlich verringert. Auch eine Korrelation zwischen den Permeabilitätskoeffizienten (PE) der drei Sesquiterpensäuren,

die in jedem Transportversuch ermittelt wurden, und den gemessenen TEER Werten wurde beobachtet.

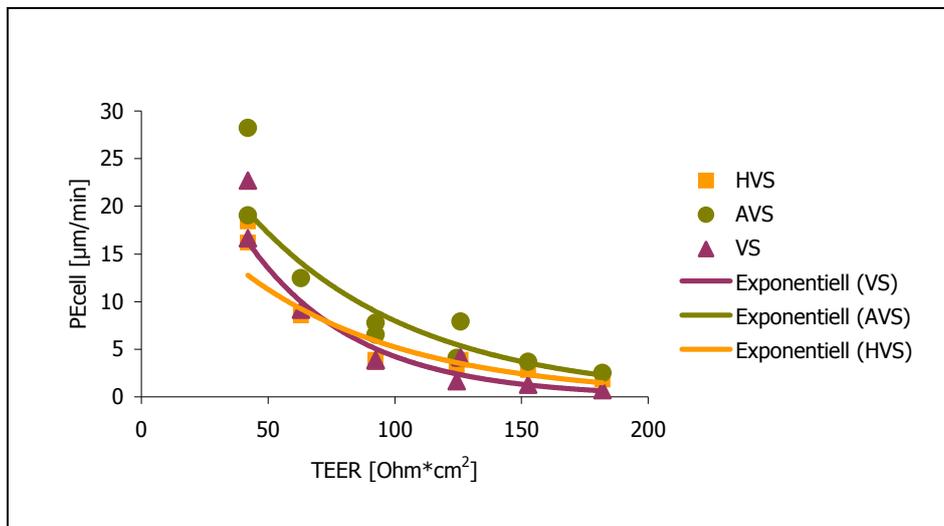


Abbildung 66: Korrelation der gemessenen TEER-Werte der *ECV304*-Zellschicht für die Gruppenstudien (vgl. Kapitel 2.6, Seite 35) und der Permeabilitätskoeffizienten (PE) der drei Sesquiterpensäuren (VS, AVS, HVS)

Alle drei Sesquiterpensäuren zeigen eine exponentielle Korrelation zwischen den TEER-Werten der Zellschicht während des Transportversuchs und den errechneten Permeabilitätskoeffizienten (siehe Abbildung 66).

Die Resultate der Permeationsstudien der Sesquiterpensäuren mittels Blut-Hirn-Schranken-Modell zeigen, dass die Substanzen auf anderem Transportweg durch dieses Modell permeieren als Diazepam, das transzellulär durch passive Diffusion ins ZNS gelangt (Neuhaus et al. 2006, Neuhaus et al. 2008).

3.2.2 Studien zur Metabolisierung von Valerensäure

Da es sich bei Baldrianpräparaten des Handels ausschließlich um perorale Arzneiformen handelt, unterliegen die wirksamen Inhaltsstoffe einem Metabolismus, bevor sie im ZNS an Rezeptoren binden können.

Aus diesen Gründen war es interessant zu untersuchen, wie und in welchem Ausmaß die Valerensäure metabolisiert wird.

Die Leber ist das wichtigste Organ, das an Biotransformationsreaktionen beteiligt ist. Am Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien konnten diese Untersuchungen am Modell der isolierten, perfundierten Rattenleber durchgeführt werden (Maier-Salamon et al. 2009, Hiltcher 2007):

Nach der Isolierung der Leber aus narkotisierten Wistar- und TR⁻-Ratten wird diese an einen künstlichen Kreislauf angeschlossen und mit einer Pufferlösung perfundiert. Die Temperatur wird konstant bei 37 °C gehalten. Zur Bestimmung der Biotransformationsprodukte der Valerensäure erfolgte eine 90 minütige Perfusion der Leber mit einer 20 µM Valerensäurelösung. Galle und Perfusat wurden gesammelt und mittels HPLC analysiert (siehe Kapitel 2.7, Seite 38f.). Es konnten sieben Metaboliten detektiert werden. Um Information über die Struktur der Metaboliten zu erhalten, wurden die Gallenproben einerseits mit β-Glukuronidase, andererseits mit Sulfatase versetzt, um mittels enzymatischer Hydrolyse eine Konjugation mit Glukuronsäure oder Schwefelsäure festzustellen. Die HPLC-Analyse resultierte in einer Reduktion der Peakflächen der Metaboliten in der mit β-Glukuronidase versetzten Probelösung, was auf eine Konjugation mit Glukuronsäure hindeutete. Gleichzeitig erhöhte sich die Peakfläche des Valerensäure-Peaks im HPLC Chromatogramm. Die Sulfatase enthaltenden Proben zeigten keine enzymatische Hydrolyse. Durch massenspektrometrische Untersuchungen stellte sich heraus, dass es zusätzlich zu Hydroxylierungs- und Oxidationsreaktionen der Valerensäure im Zuge der Biotransformation kommt. Die genaue Position der Hydroxylierung und Oxidation konnte auf Grund der geringen Substanzmenge nicht bestimmt werden. Es handelt sich um zwei Glukuronide der Valerensäure (M6, M7), vier Glukuronide der hydroxylierten Valerensäure (M1, M3, M4, M5) und ein Glukuronid der hydroxylierten Dehydro-Valerensäure (M2, siehe Abbildung 67, Seite 92). Valerensäure und die sieben Metaboliten wurden in der Galle und im effluenten Perfusat, das dem Blut entspricht, detektiert. Es wurde auch festgestellt, dass nach 90 Minuten ein Grossteil der nativen Valerensäure sowie der Metaboliten noch in der Leber zu finden war, wodurch die geringe Bioverfügbarkeit ($0,015 \pm 0,007$) erklärbar ist (Maier-Salamon et al. 2009).

Um den Mechanismus der Sekretion in die Galle zu untersuchen, wurden genetisch defekte Ratten eingesetzt (TR⁻-Ratten), denen das Transportprotein MRP2 (=multidrug resistance-associated protein 2) fehlt, das für die Elimination von organischen Anionen in die Galle verantwortlich ist. Da in der Galle dieser mutanten Tiere der Gehalt an Valerensäure und der Metabolite sehr gering blieb, konnte indirekt bewiesen werden, dass MRP2 an der Sekretion der Substanzen in die Galle beteiligt ist (Maier-Salamon et al. 2009, Hiltscher 2007).

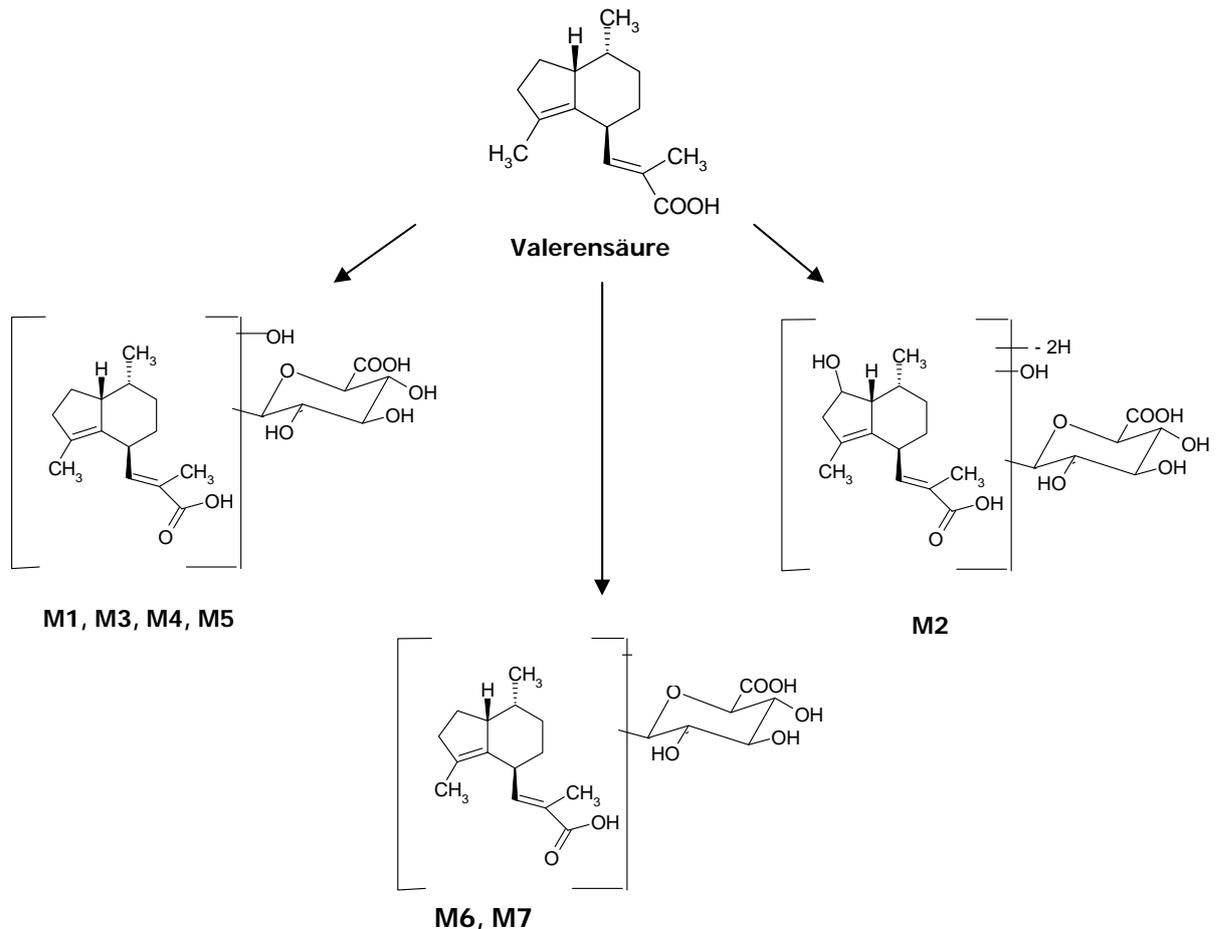


Abbildung 67: Metaboliten der Valerensäure

3.2.3 Elevated Plus Maze Test

Beim EPM handelt es sich um einen *in vivo* - Versuch an der Maus, wodurch anxiolytische Aktivität von Substanzen und Extrakten untersucht werden kann (vgl. Kapitel 2.5.2, Seite 33). Da die Testung am GABA_A-Rezeptor eine *in vitro* Untersuchung darstellte, war dieser Test eine gute Ergänzung, um die Wirkung von Baldrian-Extrakten sowie der Valerensäure *in vivo* zu testen.

3.2.3.1 Extrakte unterschiedlicher Polarität

Im Rahmen der Dissertation von M. Hattesoehl wurden fünf Baldrian-Extrakte unterschiedlicher Polarität im EPM an Versuchstieren getestet. Der Versuchsaufbau besteht aus einem Kreuz mit zwei offenen und zwei geschlossenen Armen, das sich in 30 cm Abstand vom Boden befindet. Das Versuchstier wird, nach Applikation der Versuchslösung, in die Mitte des Kreuzes gesetzt. Bewertet werden die Eintritte in die offenen Arme sowie die

Verweildauer auf den offenen Armen. Damit kann die anxiolytische Aktivität eines Extraktes oder einer Substanz bestimmt werden.

Bei den Extrakten handelte es sich um einen wässrigen Spissumextrakt (F1), einen 35%igen ethanologischen Spissumextrakt (F2), einen 35%igen ethanologischen Trockenextrakt (F3), einen 45%igen ethanologischen Extrakt (F4) und einen 70%igen ethanologischen Trockenextrakt (F5), die von einem Extrakt-Hersteller zur Verfügung gestellt wurden (Hattesoht 2006).

Bei der Testung im EPM stellte sich heraus, dass die Extrakte F2 und F3 die beste Wirkung zeigten.

Extrakte	EPM
F1	-
F2	+
F3	+
F4	(+)
F5	-

**Tabelle 24: Wirkung der Extrakt F1 – F5 (siehe Kapitel 2.5.2, Seite 33)
im Elevated Plus Maze-Test (Hattesoht 2006)**

+ = Extrakt zeigte Wirkung

- = Extrakt zeigte keine Wirkung

Da unsere Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Sesquiterpensäuren und der Modulation am GABA_A-Rezeptor zeigten, wurde auch der Gehalt an Sesquiterpensäuren in diesen untersuchten Extrakten (siehe Kapitel 2.5.2, Seite 33) bestimmt.

Extrakt	Gehalt STS [%]	
	VS	AVS
F1	0,00	0,02
F2	0,09	0,14
F3	0,13	0,14
F4	0,12	0,14
F5	0,13	0,14

**Tabelle 25: Gehalt an Valerensäure (VS) und Acetoxyvalerensäure (AVS) in den Extrakten F1 – F5
(vgl. Kapitel 2.5.2, Seite 33)**

Die quantitative Analyse dieser Extrakte bezüglich Gehalts an Valerensäure und Acetoxyvalerensäure resultierte in sehr geringen Prozentsätzen beider Substanzen (vgl. Tabelle 25, Seite 93). Im EPM-Test stellten sich die Extrakte F2 und F3 als wirksam heraus, allerdings enthielt Extrakt F2 0,09 % Valerensäure und 0,14 % Acetoxyvalerensäure, Extrakt F3 enthielt 0,13 % Valerensäure und 0,14 % Acetoxyvalerensäure.

3.2.3.2 Valerensäure

Unsere Ergebnisse am GABA_A-Rezeptor-Modell zeigten eine Stimulation des Rezeptors durch Valerensäure. Sollte die Substanz für die Wirkung von Baldrian-Extrakten verantwortlich sein, müsste sie im Tierversuch einen Effekt zeigen. Da der Extrakt F3 im EPM wirksam war, wurde die Konzentration, in welcher getestet werden sollte, nach dem Gehalt in diesem Extrakt berechnet. Im EPM wurden Extrakte in den Konzentrationen 50 mg/kg KG, 100 mg/kg KG und 250 mg/kg KG getestet (Hattesoht 2006). Daraus errechneten wir die folgenden Konzentrationen, die im ersten Versuch im EPM zur Testung kamen: 0,02 mg VS/kg KG; 0,1 mg VS/kg KG; 0,2 mg VS/kg KG und 0,65 mg VS/kg KG

Abbildung 68 und Abbildung 69 (Seite 95) zeigen das Ergebnis des ersten Versuchs:

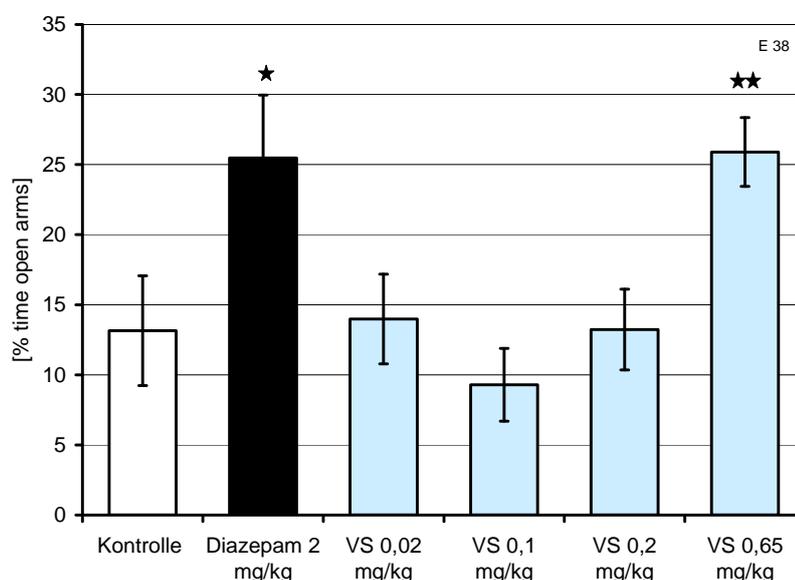


Abbildung 68: Effekt der Valerensäure (VS) im Elevated Plus Maze Test auf die Verweildauer auf den offenen Armen (vgl. Kapitel 2.5.2, Seite 33) Konzentrationen: 0,02; 0,1; 0,2 und 0,65 mg/kg KG

* = signifikant vs. Kontrolle mit $p < 0,05$

** = signifikant vs. Kontrolle mit $p < 0,01$

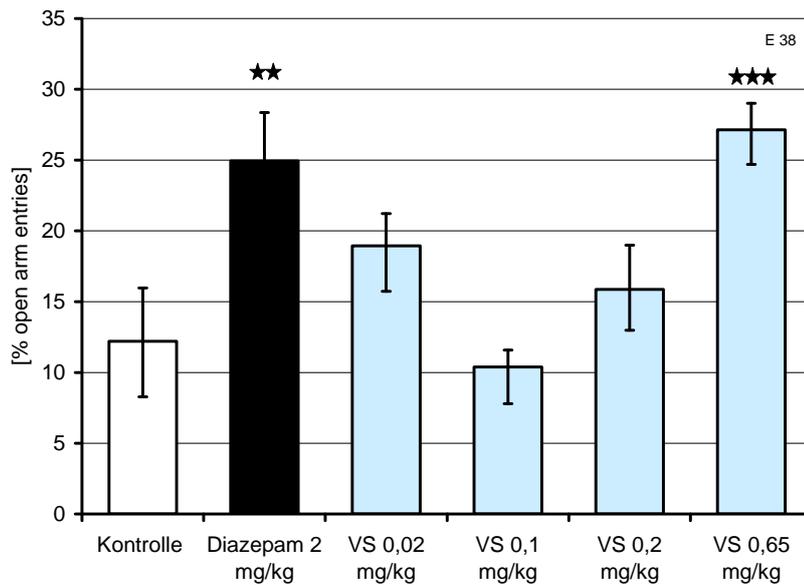


Abbildung 69: Effekt der Valerensäure (VS) im Elevated Plus Maze Test auf die Eintritte in die offenen Arme (vgl. Kapitel 2.5.2, Seite 33) Konzentrationen: 0,02; 0,1; 0,2 und 0,65 mg/kg

** = signifikant vs. Kontrolle mit $p < 0,01$

*** = signifikant vs. Kontrolle mit $p < 0,001$

Die Auswertung der Versuche ergab einen signifikanten Effekt der Valerensäure im EPM in einer Konzentration von 0,65 mg/kg Körpergewicht (KG) in beiden Parametern (Verweildauer auf den offenen Armen [%] und Eintritte in die offenen Arme [%]) (vgl. Kapitel 2.5.2, Seite 33). Als Kontrolle wurde einerseits Wasser appliziert (weißer Balken), andererseits Diazepam in einer Konzentration von 2 mg/kg KG (schwarzer Balken). Wie Abbildung 68 (Seite 94) und Abbildung 69 veranschaulichen, zeigte Valerensäure in diesem Versuch bei deutlich geringerer Konzentration eine vergleichbare Wirkung wie Diazepam. Leider konnte dieses Ergebnis bei zwei Wiederholungen des Versuchs nicht bestätigt werden (persönliche Mitteilung, Prof. H. Winterhoff).

In einem weiteren Versuch wurde eine höhere Konzentration an Valerensäure gewählt, da in handelsüblichen Extrakten ~ 0,15 – 0,26 % Valerensäure enthalten sind, was bei einer Einzeldosis von 600 mg Extrakt 0,90 – 1,56 mg Valerensäure entspricht.

Daher wurden 0,5 mg VS/kg KG; 1 mg VS/kg KG und 2 mg VS/kg KG im EPM getestet. Als Positiv-Kontrolle diente wieder Diazepam in einer Konzentration von 1,5 mg/kg KG.²

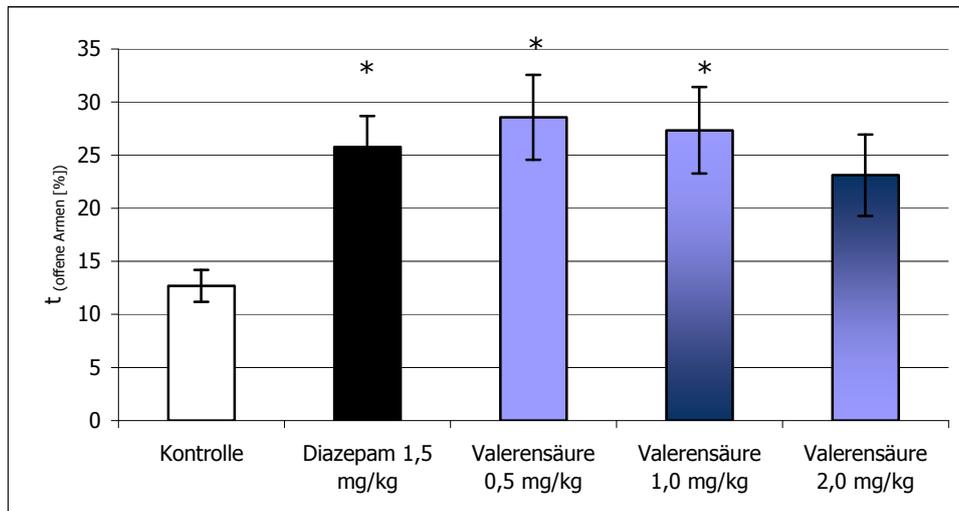


Abbildung 70: Effekt der Valerensäure (VS) im Elevated Plus Maze Test auf die Verweildauer auf den offenen Armen (vgl. Kapitel 2.5.2, Seite 33) getestet in den Konzentrationen 0,5; 1 und 2 mg/kg

* = signifikant vs. Kontrolle mit $p < 0,05$

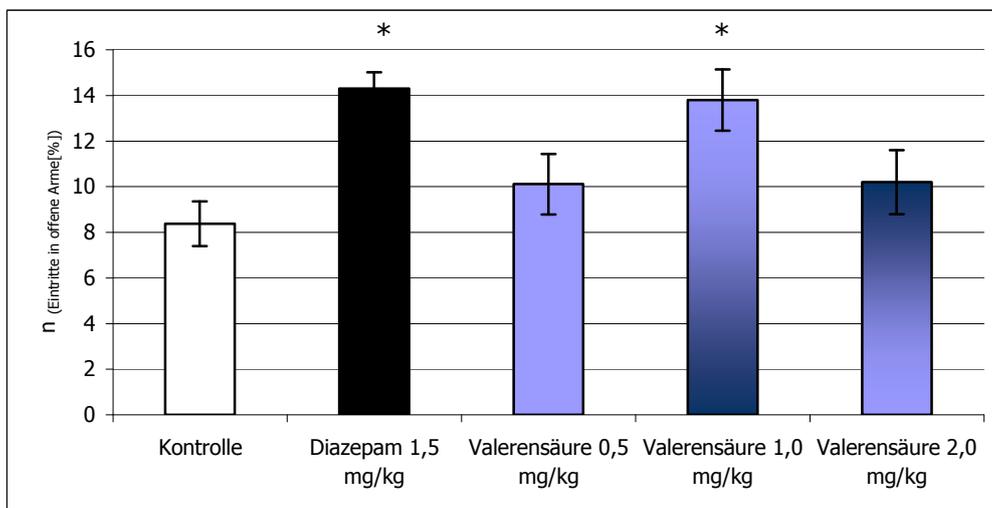


Abbildung 71: Effekt der Valerensäure (VS) im Elevated Plus Maze Test auf die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme (vgl. Kapitel 2.5.2, S. 33) getestet in den Konzentrationen 0,5; 1 und 2 mg/kg

* = signifikant vs. Kontrolle mit $p < 0,05$

² Die Wiederholungsversuche im EPM wurden von Fr. Prof. Veronika Butterweck, Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, University of Florida, durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich dafür sowie für die Interpretation der Ergebnisse herzlich bedanken.

Wie anhand von Abbildung 70 und Abbildung 71 (Seite 96) zu sehen ist, resultierten die Testungen der Valerensäure in höherer Konzentration im EPM, in einem signifikanten anxiolytischen Effekt in beiden Parametern im Vergleich zu 1,5 mg/kg Diazepam.

Da nun erste Vorversuche mit Valerensäure im Tierversuch eine anxiolytische Aktivität der Substanz zeigten, ist es nötig, weitere Untersuchungen hinsichtlich Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erstellen, um dadurch mehr Information über die Wirksamkeit der Valerensäure zu erhalten und fundiertere Aussagen bezüglich deren Beteiligung an Wirkung und Wirksamkeit von Baldrian-Extrakten treffen zu können.

4 DISKUSSION

Valeriana officinalis L. s.l. ist – in unterschiedlichen Zubereitungen - eines der am häufigsten angewendeten pflanzlichen Schlaf- und Beruhigungsmittel. Die Wirksamkeit konnte in Tiermodellen bestätigt werden (Hendriks et al. 1981, Hiller und Zetler 1996, Tokunaga et al. 2007, Hattesoehl et al. 2008).

Auch einige klinische Studien bestätigen die wirksame Anwendung von Baldrianpräparaten bei leichten und mittleren Schlafstörungen. Vor allem eine Verkürzung der Schlaflatenz und eine Verbesserung der Schlaftiefe konnten gezeigt werden.

Der große Vorteil der Einnahme dieser Phytopharmaka liegt in geringen Nebenwirkungen und einem geringen Abhängigkeitspotential im Vergleich zu synthetischen Schlaf- oder Beruhigungsmitteln bei Anwendung über einen längeren Zeitraum. Insgesamt wird die Wirksamkeit von Baldrian zur Linderung von Schlafstörungen allerdings kontrovers diskutiert (Bent et al. 2006).

Im Laufe der Zeit wurden unterschiedliche Inhaltsstoffe für die Wirkung verantwortlich gemacht und in verschiedenen pharmakologischen Modellen untersucht. Ein eindeutiges Ergebnis gibt es bisher allerdings noch nicht. So konnten weder ein Wirkmechanismus noch ein aktiver Inhaltsstoff gefunden werden, der für die Wirkung des Baldrians maßgeblich ist.

Neben den Valepotriaten und dem ätherischen Öl wurden in letzter Zeit auch Flavonoide und Lignane als wirksame Inhaltsstoffe diskutiert und untersucht (Fernández et al. 2004, Marder et al. 2003, Schuhmacher et al. 2002).

Außerdem liegen Untersuchungen an verschiedenen Rezeptoren, die sedierende oder anxiolytische Wirkung auslösen, vor. Darunter dominieren neben Bindungs- und Verdrängungsstudien an Adenosin A₁-Rezeptoren vor allem unterschiedliche Testungen an GABA_A-Rezeptoren. Der GABA_A-Rezeptor ist mit seinem natürlichen Liganden GABA der wichtigste inhibitorische Rezeptor im ZNS. Sedation, Schlaf, Anxiolyse und Muskelrelaxation werden über GABAerge Neuronen gesteuert.

In der Literatur gab es Hinweise auf eine Interaktion von Baldrianextrakten bzw. dessen Inhaltsstoffen mit dem GABA-System (Cavadas et al. 1995, Mennini et al. 1993, Santos et al. 1994a, 1994b, 1994c, Ortiz et al. 1999, Ortiz et al. 2006, Yuan et al. 2004, Granger et al. 2005). In dieser Arbeit wurde daher versucht, mehr Information über diesen Wirkmechanismus zu erhalten und jene Inhaltsstoffe zu isolieren, die an den Rezeptor binden.

Um in einem ersten Screening mehr Information über die Polarität der wirksamen Inhaltsstoffe zu erhalten, wurden unterschiedlich polare Extrakte (Petrolether, Ethylacetat,

Methanol und Wasser) sowie auch die traditionellen Zubereitungen (Tinktur, Tee) hergestellt und anschließend *in vitro* bezüglich ihrer GABA_A-Modulation getestet. Zusätzlich konnten im Handel befindliche Zubereitungen, die Extrakte unterschiedlicher Polarität enthalten, untersucht werden.

Es stellte sich heraus, dass aktive Verbindungen, die eine Modulation des GABA_A-Rezeptors bewirkten, eher in apolaren Extrakten enthalten waren. Mittelpolare - wie wässrig-methanolische und wässrig-ethanolische Extrakte - zeigten eine geringe Modulation. Polare Auszüge zeigten keine Wirkung.

Da bekannt ist, dass auch Aminosäuren im Baldrian enthalten sind und damit auch GABA in den Extrakten vorhanden sein könnte, musste das überprüft und die Substanz gegebenenfalls abgetrennt werden. Dadurch sollte vermieden werden, dass GABA falsch-positive Ergebnisse vortäuscht. Durch die Aminosäure würde ein Effekt gemessen werden, der *in vivo* nicht zustande kommen könnte, da GABA die Blut-Hirn-Schranke erst in sehr hohen Konzentrationen überwinden kann (Hespe et al. 1969).

Mit einem geeigneten Verfahren gelang es, die Aminosäuren – inklusive GABA – abzutrennen. Es stellte sich heraus, dass ausschließlich apolare Extrakte die GABA Wirkung am Rezeptor verstärkten. Polare Extrakte, die GABA nicht enthielten, zeigten keine Modulation.

Valeriana officinalis L. s.l. wird im Europäischen Arzneibuch durch den Gehalt an Sesquiterpensäuren charakterisiert. Diese Substanzen sind spezifisch für den offizinellen Baldrian und werden daher als Marker eingesetzt.

Im Zuge dieser Arbeit wurden ausschließlich Zubereitungen von *Valeriana officinalis* L. s.l. untersucht, weshalb alle Extrakte nach EuAB analysiert und quantifiziert wurden.

Dabei konnte eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an Sesquiterpensäuren und der Aktivität am Rezeptor-Modell festgestellt werden.

Aufgrund dieser ersten Ergebnisse, wurde einer der am stärksten wirksamen Extrakte, der Ethylacetat-Extrakt, fraktioniert und in weiterer Folge fraktionsweise getestet. Die Fraktionierung brachte ein interessantes Ergebnis, das die erste Vermutung, nämlich eine Korrelation zwischen dem Gehalt an STS und der Aktivität am Rezeptor, bestätigte. Es waren nur jene Fraktionen aktiv, die Sesquiterpensäuren enthielten. Allerdings waren der Gehalt und das Verhältnis von Valerensäure und Acetoxyvalerensäure nicht in allen wirksamen Fraktionen gleich. Die Stärke der Modulation von I_{GABA} variierte ebenfalls. Fraktion 1 enthielt fast ausschließlich Valerensäure. Diese Fraktion zeigte die stärkste Aktivität. Fraktion 2 enthielt VS und AVS in annähernd gleicher Konzentration. Der Gehalt an VS war ungefähr

doppelt so hoch wie in Fraktion 1, der Gehalt beider STS war fast viermal so hoch wie in Fraktion 1. Trotzdem fiel die gemessene Modulation deutlich geringer aus. Dafür verantwortlich könnte eine gegenseitige Beeinflussung der Wirkung von Valerensäure und Acetoxyvalerensäure sein, wodurch die Modulation gesenkt wird, es könnten aber auch andere, vielleicht unbekannte Substanzen, eine Interaktion oder Beeinflussung der GABA_A-Modulation bewirken.

Um den Zusammenhang zwischen einem hohen Gehalt an Valerensäure und einer starken Stimulation am Rezeptor zu bestätigen, sollten die Sesquiterpensäuren angereichert werden. Dies konnte aufgrund des Säurecharakters durch Salzbildung und Verteilung zwischen organischer und anorganischer Phase erfolgen. Dafür wurde der gelöste Extrakt alkalisiert, um die Säuren in ihre Salze überzuführen und anschließend organische Begleitstoffe mit Dichlormethan abzutrennen. Die Dichlormethan-Phase enthielt alle nicht ionischen Verbindungen, während in der wässrigen-methanolischen Phase die Salze der Sesquiterpensäuren enthalten waren. Die wässrig-methanolische Phase wurde angesäuert, um die Salze wieder in die Säuren überzuführen und sie nochmals mit Dichlormethan auszuschütteln. In der Dichlormethan-Phase waren nun die Sesquiterpensäuren angereichert. Beide Fraktionen (die „säurefreie Fraktion“ und die „Säurefraktion“) wurden am GABA_A-Rezeptor getestet. Die Säurefraktion zeigte hohe Aktivität, während die säurefreie Fraktion keine Stimulation des Rezeptors bewirkte, wodurch unsere Vermutung bestätigt wurde (Trauner et al. 2008).

Die Interaktion zwischen VS und AVS war hier nicht mehr relevant, da AVS fast vollständig zu HVS hydrolysiert worden war.

Nun sollte auch die Modulation der Sesquiterpensäuren als Reinsubstanzen, am Rezeptor getestet werden. Ausgehend von der angereicherten Säurefraktion wurden die Säuren mittels chromatographischer Methoden isoliert.

Aus der Literatur war bekannt, dass Valerensäure am Tier eine zentral dämpfende Wirkung zeigte (Hendriks et al. 1985, Hiller und Zetler 1996) und es gab auch Hinweise auf eine Interaktion der Substanz mit dem GABA_A-Rezeptor (Yuan et al. 2004). Yuan et al. zeigten eine Verminderung der basalen Neuronenaktivität im Hirnstamm, einen Effekt, der auch durch Muscimol erreicht wurde und durch Bicucullin antagonisiert werden konnte. Dies lies auf eine Interaktion von Valerensäure mit dem GABA_A-Rezeptor schließen.

Daher wurde Valerensäure in unterschiedlichen Konzentrationen an verschiedenen Kombinationen der Untereinheiten des Rezeptors getestet. Die EC₅₀ an dem am häufigsten exprimierten Rezeptor ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$) betrug 13,6 μ M. Es konnte keine Affinität zu einer der α -Untereinheiten beobachtet werden. Aus der Literatur gab es bereits Hinweise, dass der

Angriff von Valerensäure an den GABA_A-Rezeptor an einer anderen Stelle als GABA erfolgt, da [³H]Muscimol durch VS nicht verdrängt werden konnte (Cavadas et al. 1995). In den Untersuchungen am Rezeptormodell konnte bewiesen werden, dass die Bindungsstelle der Valerensäure weder mit der GABA- noch mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle ident ist. Valerensäure interagiert mit einer Bindungsstelle, an die auch Anästhetika wie Etomidat oder Loreclezol binden. Die β_2 - bzw. β_3 -Untereinheit ist für die Wirkung essentiell (Khom et al. 2007). Dieses Ergebnis konnte durch eine spätere Arbeit bestätigt werden. Benke et al. zeigten eine allosterische Interaktion mit den Bindungsstellen von GABA und den Benzodiazepinen, aber keine Verdrängung. Die Zuordnung einer Bindungsstelle wurde in dieser Arbeit jedoch in Frage gestellt, da radiomarkierte Valerensäure weder durch Etomidat, Propofol noch durch Loreclezol verdrängt wurde. Die Autoren schließen daraus, dass die Substanz an eine noch unbekannte Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor bindet (Benke et al. 2009).

Da nun bewiesen war, dass im Baldrian ein Inhaltsstoff enthalten ist, der *in vitro* eine positive Modulation am GABA_A-Rezeptor und damit eine Hyperpolarisation bewirkt, was Sedierung, Beruhigung oder Schlafinduktion zur Folge hat, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt auch *in vivo* zur Wirkung des Baldrians beiträgt. In einer Pharmakokinetik Studie konnte nach Verabreichung eines Baldrianpräparates und anschließender Hydrolyse Valerensäure im Serum der Probanden detektiert werden (Anderson et al. 2005).

Um an einen Rezeptor im ZNS zu binden, muss die Substanz jedoch die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Das sollte *in vitro* mittels eines Modells an ECV304-Zellen untersucht werden. Dabei handelt es sich um humane Nabelschnurzellen, die sich gut für *in vitro* Transportversuche eignen, da möglichst viele Eigenschaften der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke induzierbar sind und Permeabilitätsdaten eine hohe Korrelation zu *in vivo* - Daten erreichen (Neuhaus et al. 2006). Diazepam eignete sich sehr gut als interner Standard, da die Substanz die BHS transzellulär durch passive Diffusion überwindet und somit Zellschichtvariabilitäten ausgleichen kann. Zusätzlich handelt es sich um einen GABA_A-Modulator.

Es wurden sowohl Einzel-Transportversuche als auch Gruppenstudien mit Valerensäure und ihren Derivaten Acetoxyvalerensäure und Hydroxyvalerensäure durchgeführt, wodurch eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhalten wurde. Bei Permeation aller drei Substanzen gemeinsam durch dieselbe Zellschicht können Versuchsvariabilitäten verringert werden, außerdem könnte eine gegenseitige Beeinflussung im Transport aufgezeigt werden. Die drei Sesquiterpensäuren permeierten viel langsamer durch die Zellschicht als die Standardsubstanz Diazepam. Die Permeabilitätskoeffizienten, die zum besseren Vergleich der

Permeabilitäten von Substanzen berechnet wurden, lagen deutlich unter denen von Diazepam. Die Ergebnisse der Gruppenstudie bestätigten die Ergebnisse der Einzelstudien. Es kam zu keinen Verdrängungsreaktionen während des Transports.

Allerdings zeigten die Studien, dass die drei Säuren auf einem anderen Transportweg als Diazepam die Zellschicht passieren, also nicht auf transzellulärem Weg ins ZNS gelangen. Dieses Ergebnis bestätigte sich in weiteren Studien, die bei unterschiedlichen Werten des transendothelialen Widerstands (TEER) durchgeführt wurden. Diazepam permeiert TEER-unabhängig (Neuhaus et al. 2006), während die Sesquiterpensäuren bei geringeren TEER-Werten die BHS rascher überwinden konnten (Neuhaus et al. 2008). Der transendotheliale Widerstand ist ein Maß für die Ausbildung der „tight-junctions“ zwischen den Zellen. Je dichter das „tight-junctions“-Netzwerk ausgebildet ist, umso höher wird der endotheliale Widerstand.

Neuhaus et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen dem parazellulären Transportweg und TEER-Werten der Zellschicht. Je höher diese ist, desto geringer ist der parazelluläre Transport (Neuhaus et al. 2006). Angesichts der Ergebnisse unserer Studien könnte vermutet werden, dass die Sesquiterpensäuren parazellulär in das Zentralnervensystem gelangen. Allerdings ist dieser Transportweg *in vivo* sehr eingeschränkt, da das „tight-junctions“ Netzwerk *in vivo* dichter ausgebildet wird als in unserem *in vitro* Modell. Weiters muss beachtet werden, dass *in vivo* andere Transportsysteme ausgebildet sein könnten, die noch nicht bekannt sind, oder in diesem *in vitro* Modell nicht ausgebildet sind und für den Transport von Valerensäure und ihren Derivaten verantwortlich sein können.

Bei zusätzlicher Betrachtung der Wirkung dieser Substanzen am GABA_A-Rezeptor zeigte nur Valerensäure eine positive Modulation und wirkte erst in einer ~30-Mal höheren Konzentration in einer mit Diazepam vergleichbaren Weise (EC_{50} (Valerensäure) = 10 μ M, EC_{50} (Diazepam) = 300 nM) (Khom et al. 2007). Dabei darf allerdings nicht vergessen werden, dass hier nur ein möglicher Wirkmechanismus untersucht wurde, nämlich eine Modulation des GABA_A-Rezeptors. Im ZNS kann über verschiedene Mechanismen Sedierung, Anxiolyse oder Schlaf bewirkt werden – Mechanismen, die hier nicht berücksichtigt wurden. Weiters wird in der Literatur meist eine Anwendung über einen längeren Zeitraum empfohlen. In klinischen Studien konnte erst nach subakuter Gabe eine signifikante Wirkung gemessen werden (Vorbach et al. 1996). Es wäre also auch denkbar, dass Valerensäure erst nach längerer Zeit den erforderlichen Konzentrationsspiegel im ZNS erreicht.

Weitere wichtige Aspekte, die bei der Untersuchung des Beitrags der Valerensäure zur Wirkung von *Valeriana officinalis* L. s.l. nicht außer Acht gelassen werden durften, waren Resorption, Pharmakokinetik und Metabolismus dieser Substanz. Alle Zubereitungen, die

derzeit im Handel erhältlich sind, werden peroral eingenommen. Bei den bisherigen Untersuchungen von Baldrian-Extrakten oder daraus isolierten Reinsubstanzen handelt es sich meist entweder um *in vitro* Versuche an Rezeptormodellen (Mennini et al. 1993, Cavadas et al. 1995, Ortiz et al. 1999) oder intraperitoneal injizierte Versuchslösungen, wodurch der Gastrointestinal-Trakt umgangen wurde (Hendriks et al. 1981, Hendriks et al. 1985, Hiller und Zetler 1996). Ob nach peroraler Gabe dieselben Ergebnisse erhalten werden, wurde bisher jedoch nicht untersucht. Die Relevanz solcher Untersuchungen ist daher zu diskutieren solange es keine Informationen über die Bioverfügbarkeit der untersuchten Substanzen gibt.

Die Biotransformation von Arzneistoffen findet hauptsächlich in der Leber statt, wobei es zu Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse (Phase I) und in weiterer Folge zu Konjugationsreaktionen mit Glukuron- oder Schwefelsäure (Phase II) kommen kann.

Mit dem Modell der isolierten, perfundierten Rattenleber war es möglich den Metabolismus und die Elimination der Valerensäure in einem möglichst physiologischen Umfeld, ohne Einfluss anderer Organe, zu untersuchen (Hiltscher 2007, Maier Salamon et al. 2009).

Es stellte sich heraus, dass es zu Hydroxylierung, Oxidation und im folgenden Schritt zu einer Glukuronidierung dieser Verbindung kommt. Mit dieser „*ex vivo*“ Untersuchung am isolierten Organ wurden frühere *in vitro* Ergebnisse aus der Literatur untermauert (Alkharfy et al. 2007). Die Substanz und ihre Metaboliten wurden in Galle und effluentem Perfusat detektiert, allerdings nur in geringen Konzentrationen. Ein Großteil der Substanz war nach 90 Minuten noch im Lebergewebe angereichert, was die hohe Clearance, aber geringe Bioverfügbarkeit erklären lässt.

Weiters konnte festgestellt werden, dass die Valerensäure und ihre Metabolite mittels eines Membrantransporters in die Galle sezerniert werden. Es handelt sich dabei um das Transportprotein MRP2, das eine wichtige Rolle in der Elimination organischer Anionen, wie Glukuronide spielt und diese in die Galle transportiert. Mittels genetisch defekter Ratten (TR⁻-Ratten), denen dieses Protein fehlt, konnte indirekt gezeigt werden, dass es sich bei der Valerensäure und den Metaboliten um Substrate von MRP2 handelt. In TR⁻-Ratten war diese Sekretion in die Galle reduziert (Maier-Salamon et al. 2009).

Der wichtigste Nachweis der Wirksamkeit wird allerdings erst durch *in vivo* Untersuchungen erbracht. Am Versuchstier kann gezeigt werden, dass *in vitro* gezeigte Wirkungen auch *in vivo* Relevanz haben.

Ältere Versuche zeigten bereits zentral depressive und sedierende Aktivität von Extrakten, Fraktionen und auch Reinsubstanzen aus *Valeriana officinalis* L. s.l.. Allerdings handelte es sich bei diesen Arbeiten meist um intraperitoneale Applikation, was nicht der gängigen

Einnahme entspricht, auch war die Dosierung unphysiologisch hoch (Hendriks et al. 1981, Hendriks et al. 1984, Hiller und Zetler 1996).

Tokunaga et al. verabreichten einen 70%igen ethanolischen Extrakt peroral und fanden eine verkürzte Einschlafzeit bei Mäusen (Tokunaga et al. 2007).

Hattesoehl et al. testeten unterschiedliche Baldrian-Extrakte im Tierversuch. Es handelte sich dabei um Extrakte unterschiedlicher Polarität, die im Handel erhältlich sind. Untersucht wurden eine sedierende, eine antidepressive und eine anxiolytische Wirkung. Interessanterweise waren nur der polarste Extrakt, ein 35 %iger ethanolischer Extrakt und eine daraus hergestellte Fraktion im Test auf anxiolytische und antidepressive Wirkung effektiv (Hattesoehl et al. 2008). Das Ergebnis wurde mittels Elevated Plus Maze Test erhalten. Dabei handelt es sich um einen etablierten Tierversuch, der anxiolytische Aktivität von Substanzen messen lässt. In diesem Test konnte auch die Valerensäure untersucht werden. Die verabreichten Konzentrationen wurden nach dem stark wirksamen 35%igen ethanolischen Extrakt berechnet. In einem ersten Versuch wurde eine anxiolytische Aktivität der Substanz in einer Konzentration von 0,65 mg/kg gefunden, die vergleichbar war mit Diazepam, das in der Konzentration von 2,0 mg/kg appliziert wurde. Allerdings zeigten Wiederholungsversuche keine signifikante Wirkung, das Ergebnis konnte nicht bestätigt werden. In weiteren Versuchen wurde nun die Konzentration erhöht. Handelsübliche Extrakte enthalten 0,15 – 0,26 % Valerensäure, daher wurden Testkonzentrationen von 0,5; 1,0 und 2,0 mg/kg gewählt. Mit einer Konzentration von 1,0 mg/kg konnte ein eindeutig anxiolytischer Effekt der Valerensäure gezeigt werden. In nachfolgenden Untersuchungen sind nun Dosis-Wirkungs-Beziehungen ausständig, um das pharmakologische Wirkprofil dieser Substanz zu charakterisieren.

Dieses Ergebnis wurde bestätigt von Benke et al., die in zwei unterschiedlichen Tierversuchen auf anxiolytische Aktivität ein positives Ergebnis durch Valerensäure erhielten. Weiters wurde bestätigt, dass es sich um eine Interaktion mit dem GABA_A-Rezeptor handelt (Benke et al. 2009). Damit konnte auch im Tierversuch eine Wirkung der Valerensäure bestätigt werden.

Durch all diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Valerensäure nicht nur eine Markersubstanz zur Standardisierung von Valeriana radix im Europäischen Arzneibuch darstellt, sondern auch an der Wirkung dieser Arzneidroge beteiligt ist.

In vitro Versuche zeigten einen Angriff am GABA_A-Rezeptor, wodurch eine positive Modulation bewirkt wird, die bereits in der Literatur immer wieder vermutet wurde (Yuan et al. 2004, Sichardt et al. 2007). Es konnte bewiesen werden, dass die Bindung der

Valerensäure an den GABA_A-Rezeptor die Wirkung von GABA, also einen Cl⁻-Einstrom in die Zelle, verstärkt. Durch *in vivo* Versuche konnte eine Wirkung bestätigt werden. Auch eine Korrelation zu Extrakten, die Valerensäure enthalten, konnte hergestellt werden. Diese zeigten ebenfalls eine positive Modulation des Rezeptors, im Gegensatz zu jenen Extrakten die keine Valerensäure enthielten.

Trotzdem wird durch diese Arbeit wiederum deutlich, dass es schwierig ist, die Wirkung einer Arzneipflanze auf eine einzelne Substanz und einen einzelnen Wirkmechanismus zurück zu führen. Rechnet man von der wirksamen Konzentration der Valerensäure am GABA_A-Rezeptor-Modell (EC₅₀ = 10 µM) auf die dafür notwendige Dosis an Extrakt hoch, ohne Pharmakokinetik und Blut-Hirn-Schranken-Transport mit einzubeziehen, müssten Mengen eingenommen werden, die mit herkömmlich empfohlenen Dosierungen nicht erreicht werden können. Bei einem Molekulargewicht von 234 g/mol entsprechen 10 µM einer Konzentration von 2,34 µg Valerensäure pro ml. Falls im Menschen nach Einnahme eines Extraktes ausreichende Konzentrationen erreicht werden sollen, müssten bei einem Verteilungsvolumen von vier bis fünf Liter Blut mindestens 9,4 – 11,7 mg VS eingenommen werden. Dabei wurden allerdings 100%ige Resorption sowie eine ausschließliche Verteilung im Blut angenommen und der Metabolismus der Substanz nicht berücksichtigt. Werden diese Faktoren ebenfalls berücksichtigt, würde eine noch höhere Dosis benötigt werden. Allerdings konnte im Tierversuch mit einer Dosis, die der Menge der Substanz in handelsüblichen Extrakten entspricht, eine signifikante Wirkung erzielt werden.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass Valerensäure einen Effekt an einem der bedeutendsten zentralen Rezeptoren im Zusammenhang mit Schlaf, Beruhigung und Anxiolyse auslöst und Extrakte und Fraktionen, die diese Substanz enthalten dort angreifen und eine positive Modulation bewirken, wird auch immer wieder deutlich, dass dies nur ein Beitrag zur Wirkung des Gesamtextraktes sein kann.

Durch eine Vielzahl an Untersuchungen wird die Wirksamkeit von anderen Inhaltsstoffen oder Extrakten, die zu wenig oder keine Valerensäure enthalten ebenso bewiesen (Wasowski et al. 2002, Marder et al. 2003, Fernandez et al. 2004, Granger et al. 2005, Hattesoehl et al. 2008).

Gegen eine alleinige Wirkung der Substanz spricht auch, dass Sesquiterpensäuren in anderen Valeriana-Arten, wie *Valeriana walichii* oder *Valeriana edulis* fehlen, diese aber in Indien und Asien mit ähnlicher Indikation eingesetzt werden.

Neben dem Angriff an den GABA_A-Rezeptor-Komplex stehen in letzter Zeit immer häufiger auch andere Wirkmechanismen zur Diskussion. Einige Untersuchungen bewiesen einen Angriff am Adenosin A₁-Rezeptor und eine Abschwächung der Wirkung von Koffein (Vissienon et al. 2006, Müller et al. 2002, Lacher et al. 2007, Sichert et al. 2007, Schellenberg et al. 2004), auch ein partiell agonistischer Effekt am 5-HT_{5a}-Rezeptor wurde beobachtet (Dietz et al. 2005).

Es steht also außer Frage, dass *Valeriana officinalis* L. s.l. noch andere Inhaltsstoffe enthält, die für die beschriebene Wirkung „mit-verantwortlich“ sind und offenbar gibt es auch andere Angriffspunkte, als den GABA_A-Rezeptor-Komplex, über welche diese Wirkung ausgelöst wird.

Fernandez et al. liefern ebenfalls Hinweise für diese Annahme, da in ihrer Arbeit synergistische Effekte der untersuchten Flavonoide und der Valerensäure nachgewiesen werden konnten (Fernandez et al. 2004).

So kommt es möglicherweise zu einem Synergismus verschiedener Inhaltsstoffe und -stoffgruppen, da die Wirksamkeit des Gesamtextraktes immer noch der einzelner Inhaltsstoffe überlegen ist. Es kann also auch hier wieder das Grundprinzip der Phytotherapie – „der Wirkstoff ist der Extrakt“ - bestätigt werden.

Trotzdem kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt werden, dass Valerensäure zur sedierenden, schlafinduzierenden Wirkung des Baldrians beiträgt und ihr Gehalt in Zubereitungen dieser Arzneipflanze für die Qualität des Phytopharmakons mitentscheidend ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die unterirdischen Teile von *Valeriana officinalis* L. s.l. werden in Form unterschiedlicher Zubereitungen sowohl in der Volksmedizin als auch in der Phytotherapie bei Unruhezuständen und leichten Schlafstörungen angewendet. Bisher gelang es allerdings nicht, die Wirkung experimentell Inhaltsstoffgruppen zuzuschreiben sowie die Wirkmechanismen zu identifizieren.

Der bedeutendste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem ist die γ -Aminobuttersäure (GABA), der durch Bindung an den GABA_A-Rezeptor an Beruhigung, Anxiolyse und Schlafinduktion beteiligt ist.

In der Literatur gibt es einige Hinweise, dass eine Interaktion zwischen Inhaltsstoffen aus dem Baldrian und dem GABA_A-Rezeptor-Komplex besteht.

Ziel dieser Arbeit war es, Wirkung von Baldrianextrakten über den GABA_A-Rezeptor zu beweisen und Inhaltsstoffe zu isolieren, die an diesen Rezeptor binden und dadurch für diese Wirkung verantwortlich sind.

Es stellte sich heraus, dass nur die apolaren Extrakte eine positive Modulation des GABA_A-Rezeptors bewirken und es wurde eine Korrelation zwischen der Aktivität am Rezeptor und dem Gehalt an Valerensäure gefunden, die selbst als GABA_A-Modulator identifiziert wurde. Diese Substanz wird im Europäischen Arzneibuch als „Marker“ für die Qualität der Arzneidroge eingesetzt, da sie für *Valeriana officinalis* L. s.l. spezifisch ist und in aussereuropäischen Baldrian-Arten nicht vorkommt.

Da es sich bei diesen Untersuchungen allerdings um *in vitro* Versuche an einem Rezeptor, der im ZNS lokalisiert ist, handelte, war der nächste Schritt den Transport der Substanz und ihrer Derivate über ein Blut-Hirn-Schranken-Modell zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass sich der Transportweg von dem des GABA_A-Modulators Diazepam unterscheidet und es möglicherweise einen Transporter gibt, der für die Permeation der Substanzen in das ZNS verantwortlich ist allerdings in unserem *in vitro* Modell nicht exprimiert werden konnte.

Auch über den Metabolismus von Valerensäure war bisher noch wenig bekannt, weshalb mit dem Modell der isoliert-perfundierten Rattenleber die Pharmakokinetik untersucht wurde. Neben unveränderter Valerensäure konnten sieben Metabolite gefunden werden, wobei es sich um Glukuronsäure-Konjugate handelte, die unter Beteiligung des Transportprotein MRP2 in die Galle ausgeschieden werden.

Außerdem wichtig für einen Nachweis der Wirksamkeit einer Substanz sind *in vivo* Versuche. Valerensäure wurde deshalb im Elevated Plus Maze Test an der Maus auf anxiolytische Wirkung hin untersucht und zeigte dabei positive Ergebnisse.

Somit konnte Valerensäure als ein für die Wirkung von Baldrian-Zubereitungen mitverantwortlicher Inhaltsstoff identifiziert und Pharmakokinetik sowie „Blut-Hirn-Schranken-Transport“ der Substanz untersucht werden.

Diese Arbeit bietet einen weiteren Beitrag zur Aufklärung des Wirkmechanismus von *Valeriana officinalis* L. s.l., aber gleichzeitig auch den Beweis, dass die Wirkung nicht auf eine Substanz allein zurück geführt werden kann, sondern erst das Zusammenspiel mehrerer Substanzen im Extrakt die Wirkung dieser Arzneipflanze ausmacht.

6 SUMMARY

Valeriana officinalis L. s.l. has long been used in traditional medicine and phytotherapy for the treatment of mild insomnia and anxiety disorders. However, the mechanism of action and the substances responsible for its sedative and sleep enhancing properties are not fully understood.

The main receptor system being responsible for sedation, sleep and anxiolysis is the GABAergic system.

Several investigations of diverse constituents and extracts of Valerian on different molecular targets including the GABAergic system have been carried out in order to identify the molecular target and the respective active compounds of this natural drug.

The aim of this study was to verify an interaction of Valerian extracts with the GABA_A-receptor complex and to isolate compounds which bind to this receptor and cause positive modulation.

Testing different polar extracts revealed that only the apolar ones show enhancement of GABA currents. That is why a correlation between content of valerenic acid and efficacy on GABA_A channels was drawn. Further studies identify valerenic acid which is used as an analytical marker in the Pharmacopoeia Europaea as a subunit-specific allosteric modulator of GABA_A receptors.

To interact with this receptor in the central nervous system it is essential to cross blood brain barrier. Therefore it was necessary to obtain permeability data of this compound and its derivatives.

According to the outcome of this study it is hypothesized that the substances valerenic acid, acetoxyvalerenic acid and hydroxyvalerenic acid do not permeate transcellularly by passive diffusion across the blood brain barrier and presumably have to be transported by a still unknown system to be effective in the central nervous system.

Moreover pharmacokinetic data of valerenic acid in the organism have not been available yet. Hepatic metabolism and elimination of the drug and its metabolites were investigated and resulted in the detection of seven glucuronides next to valerenic acid which are all eliminated into bile via the MRP2 transporter.

Since these surveys are *in vitro* investigations and not as significant as *in vivo* experiments efficacy of valerenic acid was also approved in the Elevated Plus Maze, which is indicative of anxiolytic activity. Positive results in this test top off former results.

Thus valerenic acid was identified as an active compound present in valerian extracts which contributes to the effect of this herbal medical product.

To sum up the present work shows a further contribution to the investigation of the mechanism of action for the sedative and sleep enhancing properties of *Valeriana officinalis* L. s.l. but also shows that not only one compound is responsible for the effect of its plant extracts but synergistic actions of several compounds present in the extract account for the efficacy of this medicinal plant.

7 LITERATUR

- Alkherfy KM, Frye RF, 2007. Effect of valerian, valerian/hops extracts and valerenic acid on glucuronidation *in vitro*. *Xenobiotica* **37**, 113-123
- Anderson GD, Elmer GW, Kantor ED, Templeton IE, Vitiello MV, 2005. Pharmacokinetics of valerenic acid after administration of Valerian in healthy subjects. *Phytotherapy Research* **19**, 801-803
- Balderer G, Borbely AA, 1985. Effect of Valerian on human sleep. *Psychopharmacology* **87**, 406-409
- Barburin I, Beyl S, Hering S, 2006. Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflügers Archiv* **453**, 117-123
- Benke D, Barberis A, Kopp S, Altmann KH, Schubiger M, Vogt KE, Rudolph U, Möhler H, 2009. GABA_A receptors as *in vivo* substrate for anxiolytic action of valerenic acid, a major constituent of Valerian root extracts. *Neuropharmacology* **56**, 174-181
- Bent S, Padula A, Moore D, Patterson M, Mehling W, 2006. Valerian for sleep: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Medicine* **119**, 1005-1012
- Birnbaum GI, Findlay JA, Krepinski JJ, 1978. Stereochemistry of Valerenane sesquiterpenoids. Crystal structure of Valerenolic acid. *Journal of Organic Chemistry* **43**, 272-276
- Bodesheim U, Hölzl J, 1997. Isolierung, Strukturaufklärung und Radiorezeptorassays von Alkaloiden und Lignanen aus *Valeriana officinalis* L. *Pharmazie* **52**, 386-391
- Bos R, Hendriks H, Bruins AP, Kloosterman J, Sipma G, 1986. Isolation and identification of valerenane sesquiterpenoids from *Valeriana officinalis*. *Phytochemistry* **25**, 133-135
- Bos R, Hendriks H, Scheffer JJC, Woerdenbag HJ, 1998. Cytotoxic potential of valerian constituents and valerian tinctures. *Phytomedicine* **5**, 219-225
- Bos R, Woerdenbag HJ, Hendriks H, Zwaving WH, De Smet PAGM, Tittel G, Wikström HV, Scheffer JJC, 1996. Analytical aspects of phytotherapeutic valerian preparations. *Phytochemical Analysis* **7**, 143-151
- Bos R, Woerdenbag HJ, Putten FMS, Hendriks H, Scheffer JJC, 1998. Seasonal variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and valepotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizoms, and the selection of plants suitable for phytomedicines. *Planta Medica* **64**, 143-147
- Bos R, Woerdenberg HJ, Hendriks H, Scheffer JJC, 1997. Composition of the essential oil from underground parts of *Valeriana officinalis* L. s.l. and several closely related taxa. *Flavour and Fragrance Journal* **12**, 359-370

- Bos R, Woerdenberg HJ, Hendriks H, Scheffer JJC, 1997. Occurrence of Valerenic acid and valepotriates in taxa related to *Valeriana officinalis* L. s.l. *Scientia Pharmaceutica* **65**, 165-168
- Bounthanh C, Richtert L, Beck JP, Haag-Berrurier M, Anton R, 1983. The action of Valepotriates on the synthesis of DNA and proteins of cultured hepatoma cells. *Planta Medica* **49**, 138-142
- Braun R, Dieckmann H, Machut M, Echarti C, Maurer HR, 1986. Untersuchungen zum Einfluss von Baldriinalen auf hämatopoetische Zellen *in vitro*, auf metabolische Aktivität der Leber *in vivo* sowie zum Gehalt in Fertigarzneimitteln. *Planta Medica* **52**, 446-450
- Braun R, Dittmar W, Machut M, Weickmann S, 1982. Valepotriate mit Epoxidstruktur – beachtliche Alkylantien. *Deutsche Apotheker Zeitung* **21**, 1109-1113
- Cavadas C, Araujo I, Cotrim MD, Amaral T, Cunha AP, Marcedo T, Ribeiro CF, 1995. *In vitro* study on the interaction of *Valeriana officinalis* L. extracts and their amino acids on GABA_A receptor in rat brain. *Arzneimittelforschung/Drug Research* **45**, 753-755
- Cropley M, Cave Z, Ellis J, Middleton RW, 2002. Effect of Kava and Valerian on human physiological and psychological responses to mental stress assessed under laboratory conditions. *Phytotherapy Research* **16**, 23-27
- Denee R, Bos R, Hazelhoff B, 1979. Isolation and structure elucidation of Isovaltral, a decomposition product of Isovaltrate. *Planta Medica* **37**, 45-48
- Dharmaratne HRW, Nanayakkara NPD, Khan IA, 2002. (-)-3 β , 4 β -Epoxyvalerenic acid from *Valeriana officinalis*. *Planta Medica* **68**, 661-662
- Diaper A, Hindmarch I, 2004. A double-blind, placebo-controlled investigation of the effects of two doses of a Valerian preparation on the sleep, cognitive and psychomotor function of sleep-disturbed older adults. *Phytotherapy Research* **18**, 831-836
- Dietz BM, Mahady GB, Pauli GF, Farnsworth NR, 2005. Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT_{5a} receptor *in vitro*. *Molecular Brain Research* **138**, 191-197
- Donath F, Quispe S, Diefenbach K, Maurer A, Fietze I, Roots I, 2000. Critical evaluation of the effect of Valerian extract on sleep structure and sleep quality. *Pharmacopsychiatry* **33**, 47-53
- Dorn M, 2000. Wirksamkeit und Verträglichkeit von Baldrian versus Oxazepam bei nichtorganischen und nichtpsychiatrischen Insomnien: Eine randomisierte, doppelblinde, klinische Vergleichsstudie. *Forschende Komplementärmedizin und Klassische Naturheilkunde* **7**, 79-84

- Drexler B, Grasshoff C, Rudolph U, Unertl K, Antkowiak B, 2006. Die GABA_A-Rezeptor-Familie. *Anaesthesist* **55**, 287-295
- Dweck AC, 1997. An introduction to Valerian. In: VALERIAN – The genus Valeriana. Houghton PJ (Hrsg.) Harwood Academic Publisher. S. 1-19
- Eickstedt KW, Rahman S, 1969. Psychopharmakologische Wirkungen von Valepotriaten. *Arzneimittelforschung/Drug Research* **19**, 316-319
- ESCOP, 2003. Valerianae radix – Valerian root. ESCOP Monographs. 2nd Edition, Thieme, Stuttgart, S. 539-546
- Europäisches Arzneibuch, Amtliche Österreichische Ausgabe, Grundwerk 2005. Band 2, Monographie A-Z, Baldrianwurzel – Valerianae radix. 5. Ausgabe.
- Fernández SP, Wasowski C, Loscalzo LM, Granger RE, Johnston GAR, Paladini AC, Marder M, 2006. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology* **539**, 168-176
- Fernández SP, Wasowski C, Paladini AC, Marder M, 2004. Sedative and sleep enhancing properties of Linarin, a flavonoid isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **77**, 399-404
- Goppel M, 2003. Stabilitätsuntersuchungen pflanzlicher Zubereitungen am Beispiel von Baldrian- und Senna-Trockenextrakten. Dissertation, Universität Regensburg
- Granger RE, Campell EL, Johnston GAR, 2005. (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ GABA_A receptors. *Biochemical Pharmacology* **69**, 1101-1111
- Gross D, Edner G, Schütte HR, 1971. Über monoterpenoide Valeriana-Alkaloide. *Archiv der Pharmazie* **304**, 19-27
- Grusla D, Hölzl J, Krieglstein J, 1986. Baldrianwirkungen im Gehirn der Ratte. *Deutsche Apothekerzeitung* **41**, 2249-2253
- Hänsel R, Schulz J, 1981. GABA und andere Aminosäuren in der Baldrianwurzel. *Archiv der Pharmazie* **314**, 380-381
- Hänsel R, Schulz J, 1982. Valerensäuren und Valerenal als Leitstoffe des officinellen Baldrians. *Deutsche Apothekerzeitung* **122**, 215-219
- Hattesohl M, 2006. Pharmakologische Untersuchungen zu *Valeriana officinalis* L. s.l. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Hattesohl M, Feistel B, Sievers H, Lehnfeld R, Hegger M, Winterhoff H, 2008. Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. *Phytomedicine* **15**, 2-15

- Hendriks H, Bos R, Allersma DP, Malingré ThM, Koster ASj, 1981. Pharmacological screening of Valerenal and some other components of essential oil of *Valeriana officinalis*. *Planta Medica* **42**, 62-68
- Hendriks H, Bos R, Woerdenbag HJ, Koster ASj, 1985. Central nervous depressant activity of valerenic acid in the mouse. *Planta Medica* **51**, 28-31
- Hering S, 1998. Small-volume and rapid extracellular solution exchange around *Xenopus* oocytes during voltage-clamp recordings. *Pflügers Archiv-European journal of Physiology* **436**, 303-307
- Hespe W, Roberts E, Prins H, 1969. Autoradiographic investigation of the distribution of [¹⁴C]GABA in tissues of normal and aminooxyacetic acid-treated mice. *Brain Research* **14**, 663-671
- Hiller KO, Zetler G, 1996. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis* L.: behavioural and anticonvulsant properties. *Phytotherapy Research* **10**, 145-151
- Hiltscher RD, 2007. Metabolisierung und biliäre Elimination von Valerensäure in der perfundierten Rattenleber. Diplomarbeit, Universität Wien
- Hölzl J, 1975. Bedeutung von chemischen Rassen, Herkünften, Cultivars und Arten für die in vivo Präparation radioaktiv markierter Naturstoffe, dargestellt am Beispiel von *Valeriana*. *Planta Medica* **28**, 301-314
- Hölzl J, 1997. The pharmacology and therapeutics of *Valeriana*. In: VALERIAN – The genus *Valeriana*. Houghton PJ (Hrsg.) Harwood Academic Publisher. S. 55-75
- Houghton PJ, 1997. The chemistry of *Valeriana*. In: VALERIAN – The genus *Valeriana*. Houghton PJ (Hrsg.) Harwood Academic Publisher. S. 20-54
- Houghton PJ, 1999. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **51**, 505-512
- Kennedy DO, Little W, Haskell CF, Scholey AB, 2006. Anxiolytic effects of a combination of *Melissa officinalis* and *Valeriana officinalis* during laboratory induced stress. *Phytotherapy Research* **20**, 96-102
- Khom S, Baburin I, Timin E, Hohaus A, Trauner G, Kopp B, Hering S, 2007. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA_A receptors: Molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology* **53**, 178-187
- Koetter U, Schrader E, Käufeler R, Brattström A, 2007. A randomized, double blind, placebo-controlled, prospective clinical study to demonstrate clinical efficacy of a fixed Valerian Hops extract combination (Ze 91019) in patients suffering from non-organic sleep disorder. *Phytotherapy Research* **21**, 847-851

- Komarova EL, Tsybul'ko NS, Sheichenko VI, Khorlin AY, Fonin VS, Ivleva ZY, Popov DM, 2000. Isolation and identification of Valerenic acid from underground parts of common Valerian. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **34**, 536-539
- Lacher SK, Mayer R, Sichardt K, Nieber K, Müller CE, 2007. Interaction of valerian extracts of different polarity with adenosin receptors: Identification of isovaltrate as an inverse agonist at A₁ receptors. *Biochemical Pharmacology* **73**, 248-258
- Leathwood PD, Chauffard F, 1982. Quantifying the effects of mild sedatives. *Journal of Psychiatric Research* **17**, 115-122
- Leathwood PD, Chauffard F, 1985. Aqueous extract of Valerian reduces latency to fall asleep in man. *Planta Medica* **51**, 144-148
- Leathwood PD, Chauffard F, Heck E, Munoz-Box R, 1982. Aqueous extracts of Valerian root (*Valeriana officinalis* L.) improves sleep quality in man. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **17**, 65-71
- Leuschner J, Müller J, Rudmann M, 1993. Characterisation of the central nervous depressant activity of a commercially available Valerian root extract. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* **43**, 638-641
- Maier-Salamon A, Trauner G, Hiltcher R, Reznicek G, Kopp B, Thalhammer T, Jäger W, 2009. Hepatic metabolism and biliary excretion of valerenic acid in isolated perfused rat livers: role of Mrp2 (Abcc2). *Journal of Pharmaceutical Sciences* **in press**
- Marder M, Viola H, Wasowski C, Fernández SP, Medina JH, Paladini AC, 2003. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **75**, 537-545
- Mennini T, Bernasconi P, Bombardelli E, Morazzoni P, 1993. *In vitro* study on the interaction of extracts and pure compounds from *Valeriana officinalis* roots with GABA, benzodiazepine and barbiturate receptors in rat brain. *Fitoterapia* **64**, 291-300
- Möhler H, 2006. GABA_A receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Research* **326**, 505-516
- Morazzoni P, Bombardelli E, 1995. *Valeriana officinalis*: traditional use and recent evaluation of activity. *Fitoterapia* **66**, 99-112
- Müller CE, Schumacher B, Brattström A, Abourashed EA, Koetter U, 2002. Interaction of valerian extracts and a fixed valerian-hop extract combination with adenosin receptors. *Life Sciences* **71**, 1939-1949
- Navarette A, Avula B, Choi YW, Khan IA, 2006. Chemical fingerprinting of *Valeriana* Species: Simultaneous determination of valerenic acids, flavonoids, and phenylpropanoids

- using liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of AOAC International* **89**, 8-15
- Neuhaus W, Bogner E, Wirth M, Trzeciak J, Lachmann B, Gabor F, Noe CR, 2006. A novel tool to characterize paracellular transport: The APTS-Dextran ladder. *Pharmaceutical Research* **23**, 1491-1501
- Neuhaus W, Trauner G, Gruber D, Oelzant S, Klepal W, Kopp B, Noe CR, 2008. Transport of a GABA_A-receptor modulator and its derivatives derived from *Valeriana officinalis* L. s.l. across an *in vitro* cell culture model of the blood-brain barrier. *Planta Medica* **74**, 1338-1344
- Ortiz JG, Nieves-Natal J, Chavez P, 1999. Effects of *Valeriana officinalis* extracts on [³H]Flunitrazepam binding, synaptosomal [³H]GABA uptake, and hippocampal [³H]GABA release. *Neurochemical Research* **24**, 1373-1378
- Ortiz JG, Rassi N, Maldonado PM, Gonzales-Cabrera S, Ramos I, 2006. Commercial Valerian interaction with [³H]Flunitrazepam and [³H]MK-801 binding to rat synaptic membranes. *Phytotherapy Research* **20**, 794-798
- Reichling J, Horz KH, Bodesheim U, Schulz V, 2007. Valeriana. In: Blaschek W, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U, Keller K, Reichling J, Schulz V (Hrsg.) *HAGERS ENZYKOPÄDIE der Arzneistoffe und Drogen*, Band 16, 6. Ausgabe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S. 449-490
- Riedel E, Hänsel R, Ehrke G, 1982. Inhibition of γ -aminobutyric acid catabolism by valerianic acid derivatives. *Planta Medica* **46**, 219-220
- Santos MS, Ferreira F, Cunha AP, Carvalho AP, Macedo T, 1994. An aqueous extract of Valerian influences the transport of GABA in synaptosomes. *Planta Medica* **60**, 278-279
- Santos MS, Ferreira F, Cunha AP, Carvalho AP, Ribeiro CF, Macedo T, 1994. Synaptosomal GABA release as influenced by Valerian root extract-Involvement of the GABA carrier. *Archives Internationales de Pharmacodynamic et de Therapie* **327**, 220-231
- Santos MS, Ferreira F, Faro C, Pires E, Carvalho AP, Cunha AP, Macedo T, 1994. The amount of GABA present in aqueous extracts of Valerian is sufficient in synaptosomes. *Planta Medica* **60**, 475-476
- Schellenberg R, Sauer S, Abourashed EA, Koetter U, Brattström A, 2004. The fixed combination of Valerian and Hops (Ze91019) acts via a central adenosine mechanism. *Planta medica* **70**, 594-597
- Schneider G, Willems M, 1982. Weitere Erkenntnisse über die Abbauprodukte der Valepotriate aus *Kentranthus ruber* L. *Archiv Pharmazie* **315**, 691-697

- Schulz H, Stolz C, Müller J, 1994. The effect of Valerian extract on sleep polygraphy in poor sleepers: a pilot study. *Pharmacopsychiatry* **27**, 147-151
- Schumacher B, Scholle S, Hölzl J, Khudeir N, Hess S, Müller CE, 2002. Lignans isolated from Valerian: Identification and characterization of a new olivil derivative with partial agonistic activity at A₁ Adenosine receptors. *Journal of Natural Products* **65**, 1479-1485
- Sichardt K, Vissiennon Z, Koetter U, Brattström A, Nieber K, 2007. Modulation of postsynaptic potentials in rat cortical neurons by Valerian extracts macerated with different alcohols: Involvement of Adenosin A₁- and GABA_A-receptors. *Phytotherapy Research* **21**, 932-937
- Sieghart W, 1995. Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Pharmacological Reviews* **47**, 181-234
- Stevinson C, Ernst E, 2000. Valerian for insomnia: a systematic review of randomized clinical trials. *Sleep Medicine* **1**, 91-99
- Sticher O, 2007. Nichtglykosidische Iridiode. Baldrianwurzel. In: Hänsel R, Sticher O (Hrsg.) *Pharmakognosie Phytopharmazie*, 8. Auflage, Springer, Heidelberg, S. 838-846
- Stoll A, Seebeck E, 1957. 1. Mitteilung über *Valeriana*: Die Isolierung von Hesperetinsäure, Behensäure und von zwei unbekanntenen Säuren aus Baldrian. *Liebigs Ann Chem* **603**, 158-168
- Stoll A, Seebeck E, Stauffacher D, 1957. Isolierung und Charakterisierung von bisher unbekanntenen Inhaltsstoffen aus dem Neutralteil des frischen Baldrians. *Helvetica Chimica Acta* **40**, 1205-1229
- Thews G, Mutschler E, Vaupel P, 1999. Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen, 5. Ausgabe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S. 3, 49f.
- Thies PW, 1968. Linarin-Isovalerianat, ein bisher unbekanntes Flavonoid aus *Valeriana wallichii* D.C. *Planta Medica* **16**, 361-371
- Thies PW, Funke S, 1966. Über die Wirkstoffe des Baldrians, 1. Mitteilung: Nachweis und Isolierung von sedativ wirksamen Isovaleriansäureestern aus Wurzeln und Rhizomen von verschiedenen *Valeriana*- und *Kentranthus*-Arten. *Tetrahedron Letters* **11**, 1155-1162
- Tittel G, Chari VM, Wagner H, 1978. HPLC-Analyse von *Valeriana mexicana* Extrakten. *Planta Medica* **34**, 305-310
- Titz W, Jurenitsch J, Fitzbauer-Busch E, Wicho E, Kubelka W, 1982. Valepotriate und ätherisches Öl morphologisch und chromosomal definierter Typen von *Valeriana*

- officinalis* s.l. I. Vergleich von Valepotriatgehalt und –zusammensetzung. *Scientia Pharmaceutica* **50**, 309-324
- Titz W, Jurenitsch J, Fitzbauer-Busch E, Wicho E, Kubelka W, 1983. Valepotriate und ätherisches Öl morphologisch und chromosomal definierter Typen von *Valeriana officinalis* s.l. II. Variationen charakteristischer Komponenten des ätherischen Öls. *Scientia Pharmaceutica* **51**, 63-86
- Tokunaga S, Takeda Y, Nimoto T, Nishida N, Kubo T, Ohno T, Matsuura Y, Kawahara Y, Shinomiya K, Kamei C, 2007. Effect of Valerian extract preparation (BIM) on the sleep-wake cycle in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **30**, 363-366
- Torsell K, Wahlberg K, 1966. The structure of the principle alkaloids from *Valeriana officinalis* L., *Tetrahedron letters* **4**, 445-448
- Trauner G, Khom S, Baburin I, Benedek B, Hering S, Kopp B, 2008. Modulation of GABA_A receptors by Valerian extracts is related to the content of valerenic acid. *Planta Medica* **74**, 19-24
- Vissienon Z, Sichardt k, Koetter U, Brattström A, Nieber K, 2006. Valerian extract Ze 911 inhibits postsynaptic potentials by activation of adenosine A₁ receptors in rat cortical neurons. *Planta Medica* **72**, 579-583
- Vorbach EU, Gortelmeyer R, Brunning J, 1996. Therapie von Insomnien: Wirksamkeit und Verträglichkeit eines Baldrianpräparats. *Psychopharmakotherapie* **3**, 109-115
- Wagner H, Blatt S, 1996. *Plant Drug Analysis – A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2. Ausgabe, Springer, Berlin, S. 362
- Wagner H, Jurcic K, 1979. Über die spasmolytische Wirkung des Baldrians. *Planta Medica* **37**, 84-95
- Wasowski C, Marder M, Viola H, Medina JH, Paladini AC, 2002. Isolation and identification of 6-Methylapigenin, a competitive ligand for brain GABA_A receptors, from *Valeriana walichii*. *Planta Medica* **68**, 932-934
- Wichtl M, 2003. Baldrian. Das meist gebrauchte pflanzliche Sedativum. *Zeitschrift für Phytotherapie* **24**, 87-92
- Yuan C, Mehendale S, Xiao Y, Aung H, Xie J, Ang-Lee MK, 2004. The gamma-aminobutyric acidergic effect of Valerian and valerenic acid on rat brainstem neuronal activity. *Anesthesia Analgesia* **98**, 353-358
- Ziegler G, Ploch M, Miettinen-Baumann A, Collet W, 2002. Efficacy and tolerability of Valerian extrakt LI 156 compared with Oxazepam in the treatment of non-organic insomnia – a randomised, double-blind comparative clinical study. *European Journal of Medicinal Research* **7**, 480-486

ANHANG

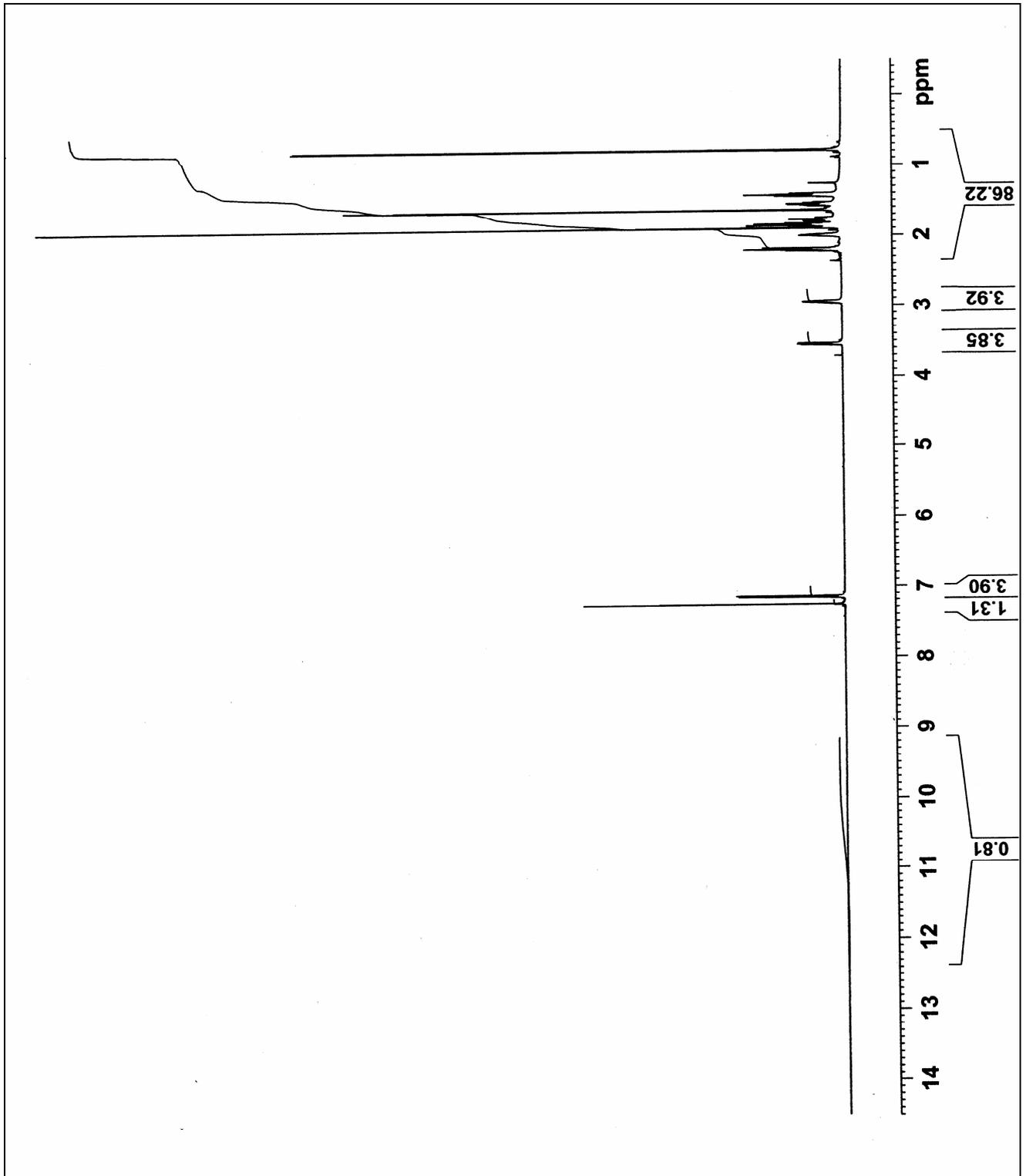


Abbildung I: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der Valerensäure (NMR-Parameter vgl. Kapitel 2.4, Seite 30)

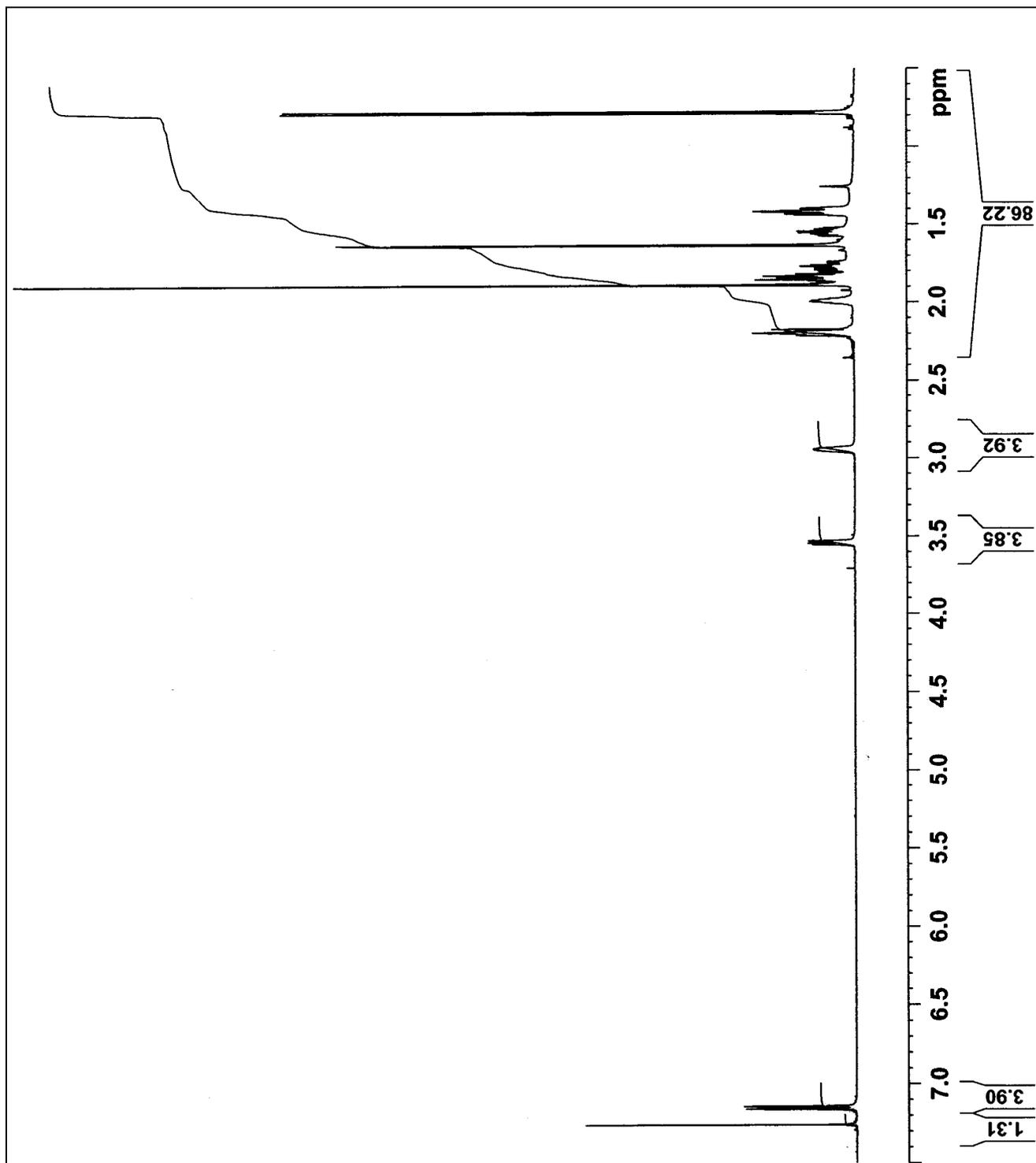


Abbildung II: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der Valerensäure (NMR-Parameter vgl. Kapitel 2.4, Seite 30)

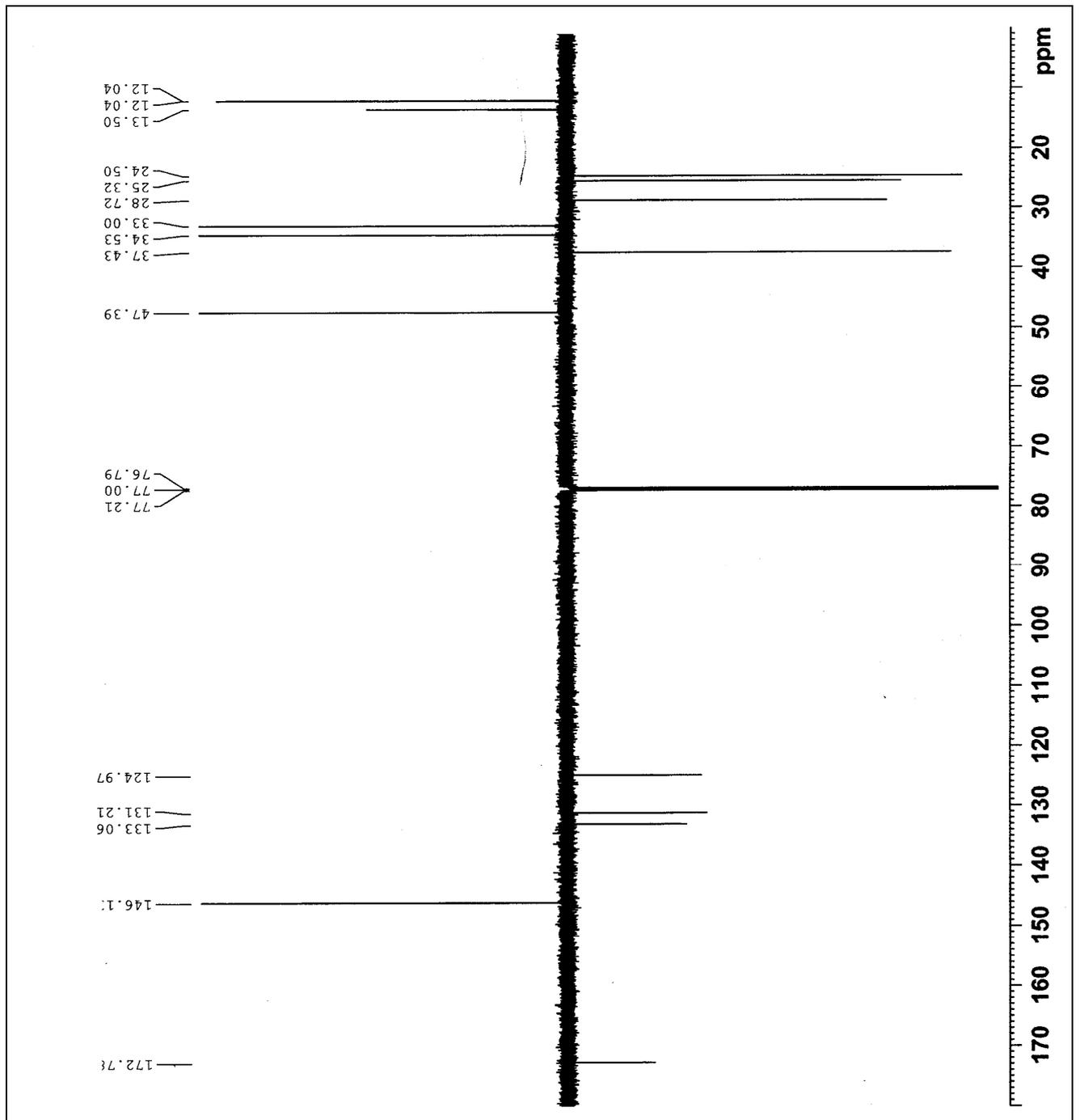


Abbildung III: ^{13}C -NMR Spektrum der Valerensäure (NMR-Parameter vgl. Kapitel 2.4, Seite 30)

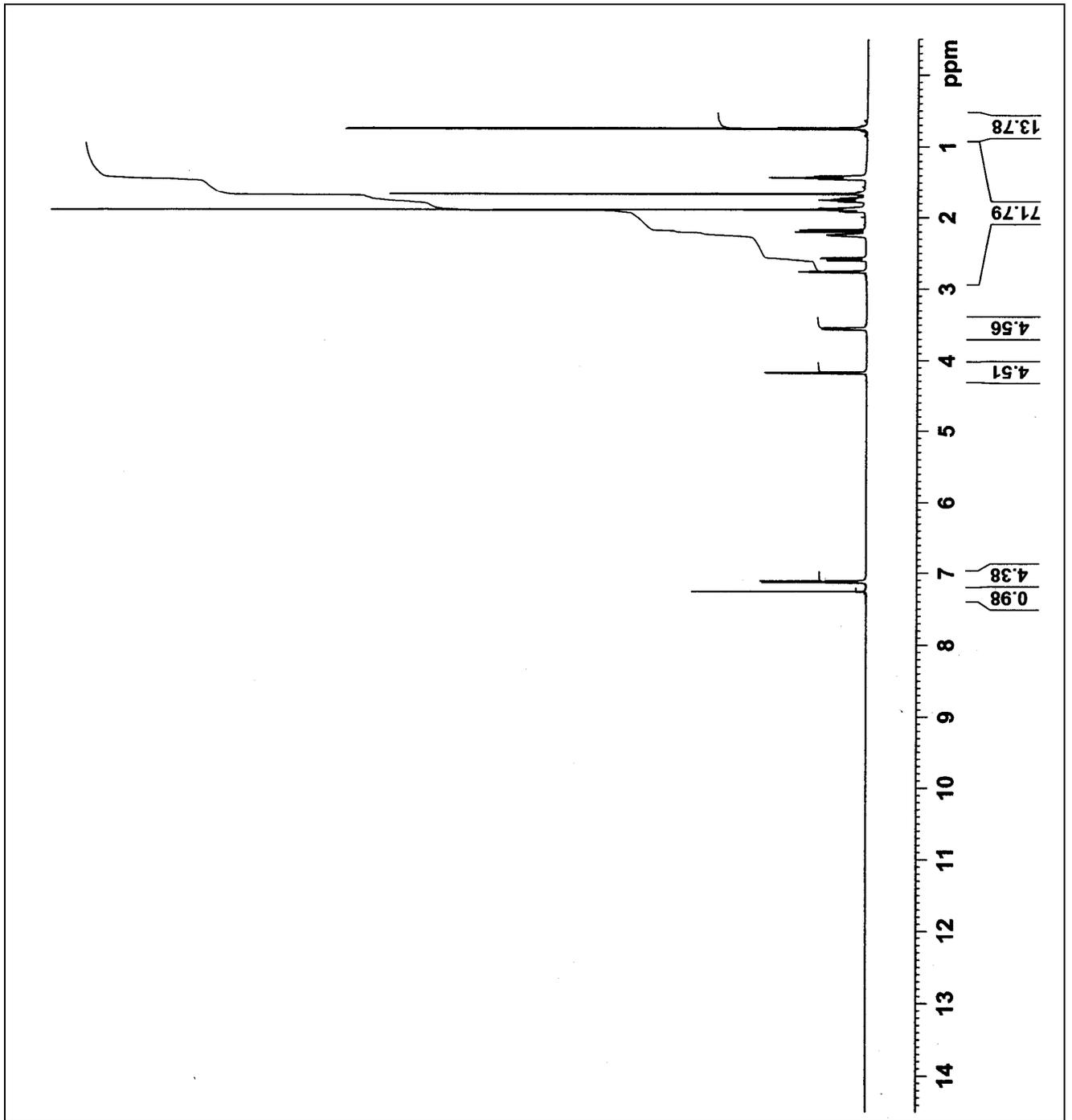


Abbildung IV: ¹H-NMR Spektrum der Hydroxyvalerensäure (NMR-Parameter vgl. Kapitel 2.4, S. 30)

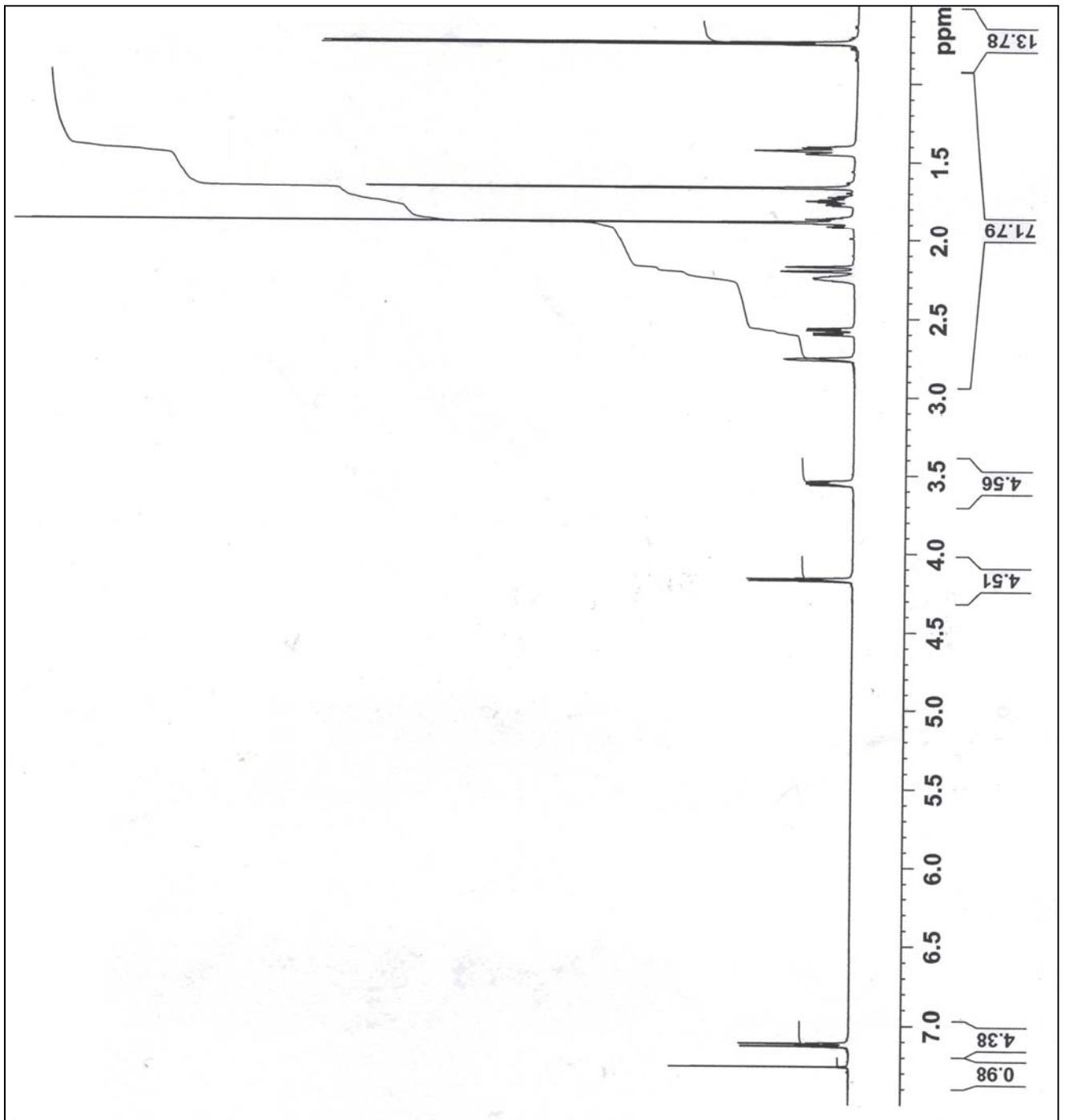


Abbildung V: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der Hydroxyvalerensäure (NMR-Parameter vgl. Kapitel 2.4, S. 30)

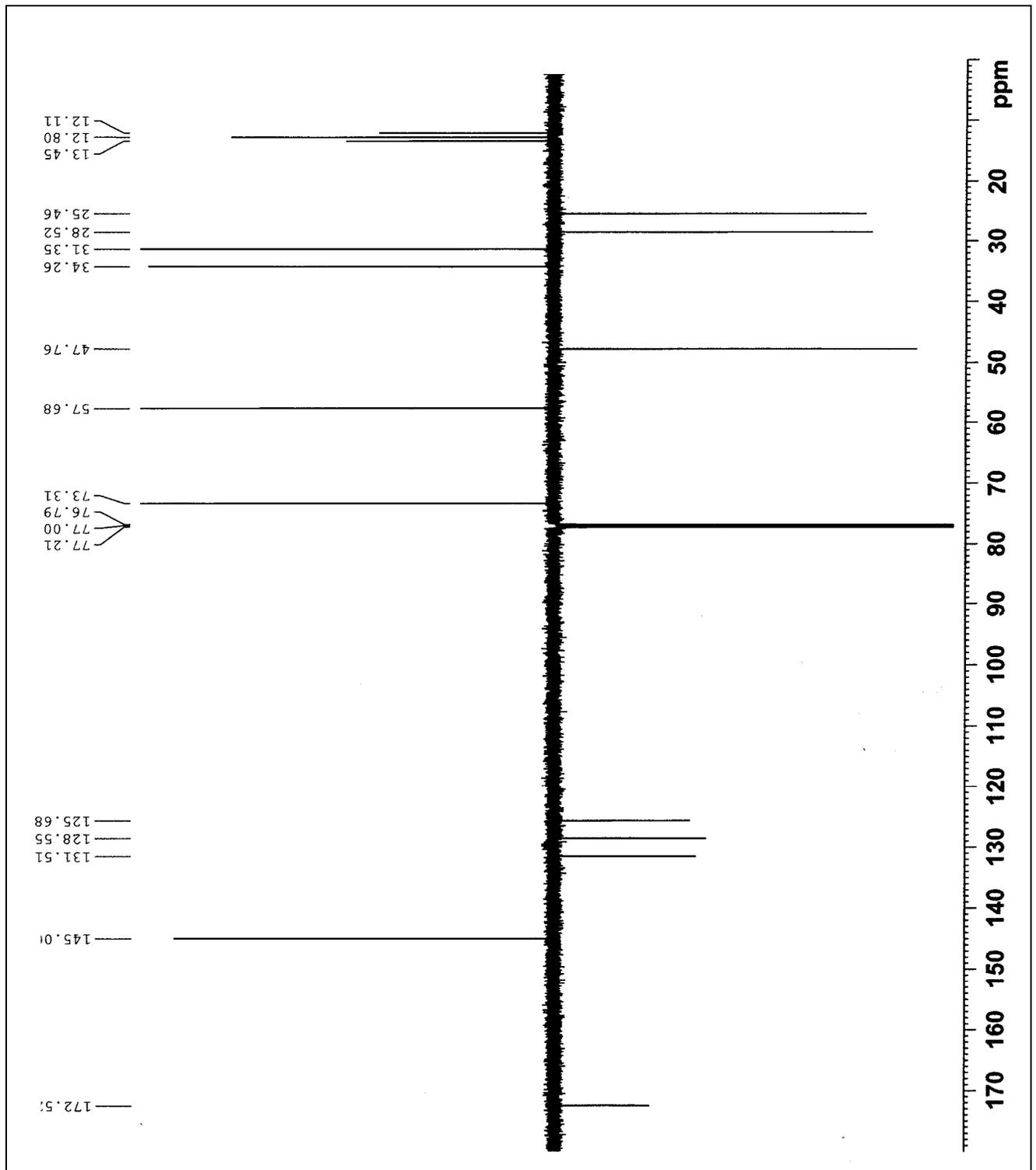


Abbildung VI: ^{13}C -NMR Spektrum der Hydroxyvalerensäure (NMR-Parameter vgl. Kapitel 2.4, S. 30)

Curriculum vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Mag. pharm. Gabriele Trauner
Adresse: Bahnzeile 13, 2380 Perchtoldsdorf
Geburtsdaten: 28. April 1981, Wien
Staatsbürgerschaft: Österreich
Familienstand: ledig
Eltern: Prof. Mag. pharm. Wolfgang Trauner
Dr. Mag. pharm. Elisabeth Trauner

AUSBILDUNG

seit Jänner 2005 Doktoratsstudium der Naturwissenschaften am Department für Pharmakognosie, Universität Wien
29. Oktober 2004 Diplomprüfung
Okt. 1999 – Okt. 2004 Studium der Pharmazie an der Universität Wien
Feb. 2004 – Juni 2004 Praktische Arbeit an der Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie („Über die Dicafeoylchinasäuren in *Herba Millefolii*“)
Juni 1999 Matura
Sept. 1991 – Juni 1999 BG & BRG Perchtoldsdorf; Schulzweig Musisches Gymnasium
1991 – 1997 Konservatorium der Stadt Wien; Unterrichtsfach Violoncello
Sept. 1987 – Juni 1991 VS Roseggergasse, Perchtoldsdorf

BERUFSERFAHRUNG

seit Aug. 2008 St. Markus Apotheke, 1030 Wien; Teilzeitbeschäftigung
Jän. 2007 – Juli 2008 Merz Pharma Austria GmbH; Qualitätsmanagement
Jän. 2007 – Juli 2007 Soziales Netzwerk, 1030 Wien; Lehrbeauftragte in der Krankenpflegerausbildung („Pharmakologie für Krankenpfleger“)
März 2004 – März 2008 Department für Pharmakognosie, Universität Wien; Tutorin
Juli 2001, 2002, 2003, 2004 Dr. Kolassa & Merz GmbH, 1230 Wien; Ferialpraktikum
Juli 1999, 2000 St. Markus Apotheke, 1030 Wien; Ferialpraktikum

PUBLIKATIONEN

- Trauner G, Khom S, Baburin I, Benedek B, Hering S, Kopp B, 2008. Modulation of GABA_A receptors by Valerian extracts is related to the content of valerenic acid. *Planta Medica* **74**, 19-24
- Maier-Salamon A, Trauner G, Hiltcher R, Reznicek G, Kopp B, Thalhammer T, Jäger W, 2009. Hepatic metabolism and biliary excretion of valerenic acid in isolated perfused rat livers: role of Mrp2 (Abcc2). *Journal of Pharmaceutical Sciences* **in press**
- Neuhaus W, Trauner G, Gruber D, Oelzant S, Klepal W, Kopp B, Noe CR, 2008. Transport of a GABA_A-receptor modulator and its derivatives derived from *Valeriana officinalis* L. s.l. across an *in vitro* cell culture model of the blood-brain barrier. *Planta Medica* **74**, 1338-1344
- Khom S, Baburin I, Timin E, Hohaus A, Trauner G, Kopp B, Hering S, 2007. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA_A receptors: Molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology* **53**, 178-187

POSTER UND KURZVORTRÄGE

- Trauner G, Neuhaus W, Noe CR, Kopp B: The Transport of GABA_A-receptor Modulators derived from *Valeriana officinalis* L. across the Blood-Brain Barrier. 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Graz, Österreich, 2007
- Trauner G, Khom S, Benedek B, Hering S, Kopp B: Identification of GABA_A-modulators obtained from *Valeriana officinalis* L. 54th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Helsinki, Finland, 2006
- Trauner G, Khom S, Hering S, Kopp B: Identification of GABA_A-modulators obtained from *Valeriana officinalis* L. Young Researcher's Workshop, 54th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Helsinki, Finland, 2006