

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungs- & Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Materialien und deren Bezugsquellen sind im Folgenden aufgelistet.

2.1.1 Enzymassay

Für das Enzymassay wurden folgende Reagenzien und Materialien verwendet.

4-(2-Hydroxyethyl-)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
p-Nitrophenyl- α -D-maltoheptaosid (PNPG7)	Calbiochem über Merck KGaA, Darmstadt
p-Nitrophenyl- α -D-maltopentaosid (PNPG5)	Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Irland
α -Amylase (EC 3.2.1.1)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acarbose	Bayer AG, Pharma Forschungszentrum Aprath
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt
96-well-Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen

2.1.2 Pflanzenmaterial

2.1.2.1 Pflanzen aus Mali

Das untersuchte Pflanzenmaterial aus Mali wurde gesammelt und bestimmt von Dr. Bizimana (Berlin).

Tab. 2: untersuchte Pflanzen aus Mali

Pflanze	Verwendeter Pflanzenteil
<i>Acacia nilotica</i> (L.) Willd. ex Delile	Stammrinde
<i>Acacia nilotica</i> (L.) Willd. ex Delile	Wurzelrinde
<i>Afzelia africana</i> Sm. ex Pers.	Stammrinde
<i>Ampelocissus africana</i> (Lour.) Merr.	Oberirdische Teile
<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr.	Blätter
<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr.	Wurzelrinde
<i>Balanites aegyptiaca</i> (L.) Del.	Pflanze
<i>Balanites aegyptiaca</i> (L.) Del.	Stammrinde
<i>Balanites aegyptiaca</i> (L.) Del.	Wurzeln
<i>Bauhinia reticulata</i> DC.	Blätter
<i>Boscia angustifolia</i> A. Rich.	Stammrinde
<i>Boscia angustifolia</i> A. Rich.	Blätter und Zweige
<i>Cassia sieberiana</i> DC.	Wurzel
<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Stammrinde
<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Wurzelrinde
<i>Cissus quadrangularis</i> L.	Blätter
<i>Cochlospermum tinctorium</i> A. Rich.	Wurzeln
<i>Combretum glutinosum</i> Perr. ex DC.	Stammrinde

<i>Combretum micranthum</i> G. Don	Blätter
<i>Detarium senegalense</i> Gmel.	Blätter
<i>Diospyros mespiliformis</i> Hochst. ex A. DC.	Blätter
<i>Entada africana</i> Guill. & Perrott.	Wurzeln
<i>Ficus iteophylla</i> Miq.	Blätter
<i>Gardenia triacantha</i> DC.	Wurzeln
<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel	Blätter
<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel	Wurzeln
<i>Holarrhena floribunda</i> G.Don	Blätter
<i>Khaya senegalensis</i> Desr (A.Juss)	Stammrinde
<i>Lawsonia alba</i> Lam.	Blätter und Zweige
<i>Lannea microcarpa</i> Engl. & Krause	Blätter
<i>Lannea microcarpa</i> Engl. & Krause	Stammrinde
<i>Leptadenia hastata</i> (Pers.)Dec'ne.	Oberirdische Teile
<i>Loranthus pentagonia</i> DC.	Pflanze
<i>Maytenus senegalensis</i> (Lam.) Exell.	Blätter
<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) O. Kuntze	Blätter
<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) O. Kuntze	Stammrinde
<i>Opilia celtidifolia</i> (Guill. & Perr.) Endl. ex Walp.	Blätter und Zweige
<i>Parinari curatellifolia</i> Planch. ex Benth.	Stammrinde
<i>Securidaca longepedunculata</i> Fers.	Wurzeln
<i>Sterculia tomentosa</i> Guill. & Perr.	Stammrinde

<i>Sterculia tomentosa</i> Guill. & Perr.	Wurzeln
<i>Strychnos spinosa</i> Lam.	Wurzeln
<i>Tamarindus indica</i> L.	Blätter
<i>Terminalia avicenoides</i> Guill. & Perr.	Stammrinde
<i>Terminalia avicenoides</i> Guill. & Perr.	Wurzelrinde
<i>Terminalia avicenoides</i> Guill. & Perr.	Blätter
<i>Trichilia emetica</i> Vahl.	Stammrinde

2.1.2.2 Übriges Pflanzenmaterial

Das weitere Pflanzenmaterial wurde über die angegebenen Quellen bezogen.

Tab. 3: sonstiges Pflanzenmaterial

Pflanze	Bezugsquelle
<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze Trockenextrakt	Flachsmann AG/Frutarom, Schweiz (Ch.-B.:85942-30000220)
<i>Cinnamomum verum</i> J.S.Presl. Rinde	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
<i>Cynara cardunculus</i> L. ssp. <i>flavescens</i> Winkl. Blütenknospen- Presssaft	W. Schoenenberger GmbH & Co. KG, Magstadt (Ch.-B.: 40574154)
Kraut	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
Hydrophiler Extrakt	Lichtwer AG (Ch.-B.: 02032466)
Lipophiler Extrakt	Lichtwer AG (Ch.-B.:02032465)
Königs-Artischockenextrakt	Lichtwer AG (Ch.-B.:02030999)

<i>Galega officinalis</i> L.	Kraut	Heinrich Klenk GmbH & Co. KG, Schwebheim
<i>Malus domestica</i> Borkh.	Presssaft der Früchte	eigene Ernte
<i>Melissa officinalis</i> L.	Blätter	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
<i>Momordica foetida</i> Schumach.	Kraut	gesammelt und bestimmt von Dr. Onegi, Uganda
<i>Morus alba</i> L.	Presssaft der Früchte	gesammelt und bestimmt von Prof. Melzig
	getrocknete Blätter	gesammelt und bestimmt von Prof. Melzig
<i>Morus rubra</i> L.	Presssaft der Früchte	gesammelt und bestimmt von Prof. Melzig
<i>Ononis spinosa</i> L.	Trockenextrakt	Strathmann AG (Ch.-B.: 00220322)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Trockenextrakt	Strathmann AG (Ch.-B.: 00220511)
	Pericarp	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
<i>Plantago ovata</i> Forssk.	Samen	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
<i>Pyrus communis</i> L.	Presssaft der Früchte	eigene Ernte

<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Blätter	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
<i>Salvia officinalis</i> L.	Blätter	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
<i>Taraxacum officinale</i> Web. ex Wigg.	Kraut mit Wurzel	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	Samen	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC	Rinde	Zieten-Apotheke, Berlin
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Blätter	Caesar & Loretz GmbH, Hilden

2.1.3 Testsubstanzen

Folgende Substanzen wurden im Screening untersucht.

Tab. 4: Testsubstanzen

INN-Name	IUPAC-Name	Firma
Aesculin	6-(β -D-Glucopyranosyloxy)-7-hydroxy 2H-1-benzopyran-2-on	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon)	5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Apigenin-7-glucosid	7-(β -D-Glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

p-Arbutin	4-Hydroxyphenyl- β -D-glucopyranosid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
(\pm) Catechin	2-(3,4-Dihydroxyphenyl) 3,4-dihydro-2H-1-Benzopyran-3,5,7-triol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chinasäure	1,3,4,5-Tetrahydroxycyclohexan-carbonsäure	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Chlorogensäure	3-[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-prop-2-enyloxy]-1,4,5-trihydroxy-cyclohexan-1-carbonsäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Chrysin	5,7-Dihydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cynarin	1,3-bis[[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-4,5-dihydroxy-cyclohexan-1-carbonsäure	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Dihydrokaffeesäure	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propansäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3(3,4-Dimethoxyphenyl)-propansäure	3(3,4-Dimethoxyphenyl)-propansäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
(-)-Epicatechin	(2R,3R)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-1-Benzopyran-3,5,7-triol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Epigallocatechingallat	3,4-Dihydro-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-2H-1-benzopyran-3,5,7-triol-3-(3,4,5-trihydroxybenzoat)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure)	3-(4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl)prop-2-ensäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Fisetin	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Fruktose		Merck KgaA, Darmstadt
D-(+)-Fukose	6-Desoxy-D-galaktose	Merck KgaA, Darmstadt
D-(+)-Galaktose		Merck KgaA, Darmstadt
Gallussäure	3,4,5-Trihydroxybenzoesäure	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
D-Glukose	D-Glucopyranose	Merck KgaA, Darmstadt
2-Hydroxyzimtsäure (o-Cumarsäure)	3-(2-Hydroxyphenyl)prop-2-ensäure	Merck KgaA, Darmstadt
3-Hydroxyzimtsäure (m-Cumarsäure)	3-(3-Hydroxyphenyl)prop-2-ensäure	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
4-Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure)	3-(4-Hydroxyphenyl)prop-2-ensäure	Merck KgaA, Darmstadt
Hesperetin	2,3-Dihydro-5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Hesperidin (Hesperetin-7-O-(6-O-rhamnosyl)glucosid)	7-[[6-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-2,3-dihydro-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)- 4H-1-benzopyran-4-on	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

“Isochlorogensäure”		Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Gemisch aus :		
<i>Isochlorogensäure A</i>	3,5-bis-[[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4-dihydroxycyclohexancarbonsäure	
<i>Isochlorogensäure B</i>	3,4-bis-[[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,5-dihydroxycyclohexancarbonsäure	
<i>Isochlorogensäure C</i>	4,5-bis-[[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,3-dihydroxycyclohexancarbonsäure	
Isoferulasäure	3-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)prop-2-ensäure	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Kaffeesäure	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)prop-2-ensäure	Merck KGaA, Darmstadt
Luteolin	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Luteolin-7-glucosid	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-7-(β-D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-4H-1-benzopyran-4-on	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Naringenin	2,3-Dihydro-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Naringin (Naringenin-7-O-(2-O-rhamnosyl)-glucosid)	7-[[2-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-2,3-dihydro-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Quercetin	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-Benzopyran-4-on	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Quercitrin (3-O-Rhamnosylquercetin)	3-[(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)oxy]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
α -L-Rhamnose	6-Desoxy- α -L-mannopyranose	Merck KgaA, Darmstadt
Rosmarinsäure	[[2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-3,4-dihydroxy-benzenpropansäure	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Rutin (Quercetin 3-O-rutinosid)	3-[[6-O-(6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on	Merck KgaA, Darmstadt
Saccharose	β -D-Fructofuranosyl- α -D-Glucopyranosid	Merck KgaA, Darmstadt
Scopoletin	7-Hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-on	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure)	3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-phenyl)prop-2-ensäure	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Tannin		Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

2.1.4 Analytik

2.1.4.1 HPLC

HPLC-Säule LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) [4 x 125 mm]	Merck KgaA, Darmstadt
HPLC-Säule LiChrospher® 100 RP-8 (5 µm) [4 x 125 mm]	Merck KgaA, Darmstadt
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt
Acetonitril	J.T. Baker, Niederlande
Essigsäure	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze

2.1.4.2 DC

DC-Alufolien RP-18 F _{254S} 20x20 cm, Schichtdicke 200 µm	Merck KgaA, Darmstadt
DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 20x20 cm, Schichtdicke 200 µm	Merck KgaA, Darmstadt
Ethylacetat	Merck KgaA, Darmstadt
Ameisensäure	Merck KgaA, Darmstadt
Acetonitril	J.T. Baker, Niederlande
Essigsäure	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze

Methanol	Merck KgaA, Darmstadt
Ethanol	KMF Laborchemie, Lohmar
Diphenylborsäure- β -ethylaminoester	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Polyethylenglykol 4000	Merck KgaA, Darmstadt

2.1.5 Blutzuckeruntersuchungen

Accu-Chek [®] Sensor Comfort Teststreifen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Accu-Chek [®] Softclix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Artischocken-Kapseln mit Artischocken-Spezial-Extrakt (100 mg/Kapsel) Ch.-B.: 05050177	Lichtwer Pharma GmbH, Berlin
Glucobay [®] 50	Bayer AG, Leverkusen

Die verwendeten Lösungsmittel wiesen HPLC-Qualität auf. Die Testsubstanzen wurden, sofern verfügbar, in den Qualitäten „rein“ bzw. „reinst“ verwendet.

2.2 Geräte

2.2.1 Enzymassay

Plattenphotometer Tecan Spectra Fluor	Tecan, Österreich
---------------------------------------	-------------------

2.2.2 Analytik

2.2.2.1 *Dünnschichtchromatographie*

DC-Auftragegerät Linomat IV	Camag, Schweiz
UV-Lampe UV-Kabinett II	Camag, Schweiz

TIDAS-TLC 2010 Diode Array Scanner	J&M Analytische Mess- und Regeltechnik GmbH, Aalen
Heizplatte	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Bonn
Digitalkamera	Canon Power Shot G5, Japan

2.2.2.2 HPLC

HPLC-Anlage LC 10	Shimadzu, Japan
-------------------	-----------------

2.2.3 Blutzuckeruntersuchungen

Accu-Chek [®] Comfort Blutzuckermessgerät	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
--	----------------------------------

2.2.4 Sonstige Geräte

Analysenwaage AC 210 D	Sartorius, Göttingen
UV-Vis-Spektralphotometer UV 2101 PC	Shimadzu, Japan
pH-Messgerät	Schott AG, Mainz
Ultraschallbad Sonorex RK 100	Bandelin Electronic, Berlin
Vortex Genie II	Scientific Industries, USA
Laborwaage MC 1	Sartorius, Göttingen
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg

2.3 Methoden

2.3.1 Enzymassay

Zur Bestimmung der α -Amylase Aktivität werden verschiedene Methoden beschrieben, wobei sich in neuerer Zeit die kinetischen Methoden unter Nutzung von 4-Nitrophenyl- bzw. 2-Chloro-4-nitrophenylmaltoligosacchariden als chromogene Substrate zunehmend durchsetzen. Die IFCC Methode zur Bestimmung der α -Amylase ist die kinetische Bestimmung unter Nutzung von 2-Chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotriosid und kontinuierlicher Messung bei 405 nm (IFCC, 1999).

Unter Einwirkung des kohlenhydratspaltenden Enzyms α -Amylase wird der Zuckerrest am Substrat endogen abgespalten, die Absorption des freigesetzten Chromophors p-Nitrophenol kann anschließend vermessen werden. Der Anstieg der Absorption pro festgelegter Zeiteinheit gilt als Maß für die Aktivität des Enzyms (Soor & Hincke, 1990; Gella et al., 1997; Wallenfells et al., 1980; Junge et al., 2001).

Zur Definition der Messwellenlänge wurde zunächst ein Absorptionsspektrum von p-Nitrophenol aufgenommen.

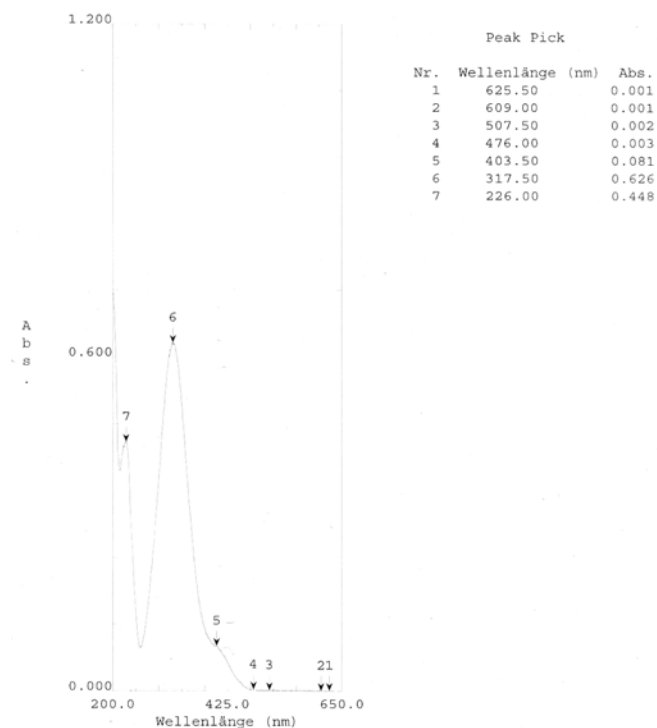


Abb. 4: Absorptionsspektrum von p-Nitrophenol

Um den Einfluss störender Substanzen gering zu halten, wurde die Messwellenlänge auf 405 nm festgelegt.

Für die Erstellung der Bestimmungsmethode wurde mit p-Nitrophenyl- α -D-maltoheptaosid (PNPG7) gearbeitet. Dazu wurden zunächst die Konzentrationen des Enzyms bei konstanter Substratmenge variiert.

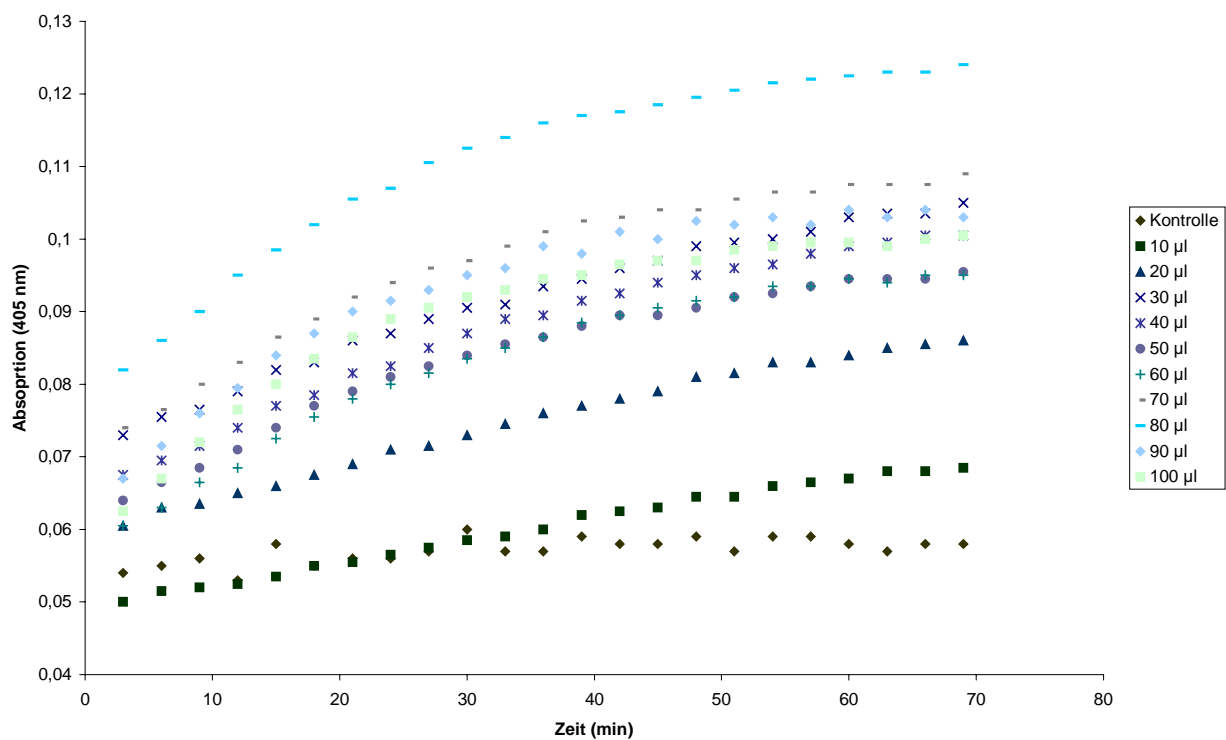


Abb. 5: Methodenetablierung; konstante Substratmenge (PNPG7: 375 μ g/ml), variable Enzymmenge (Enzymstammlösung mit 100 U/ml)

Als praktikabler erwies sich die Variation der Substratkonzentration bei konstanter Enzymmenge.

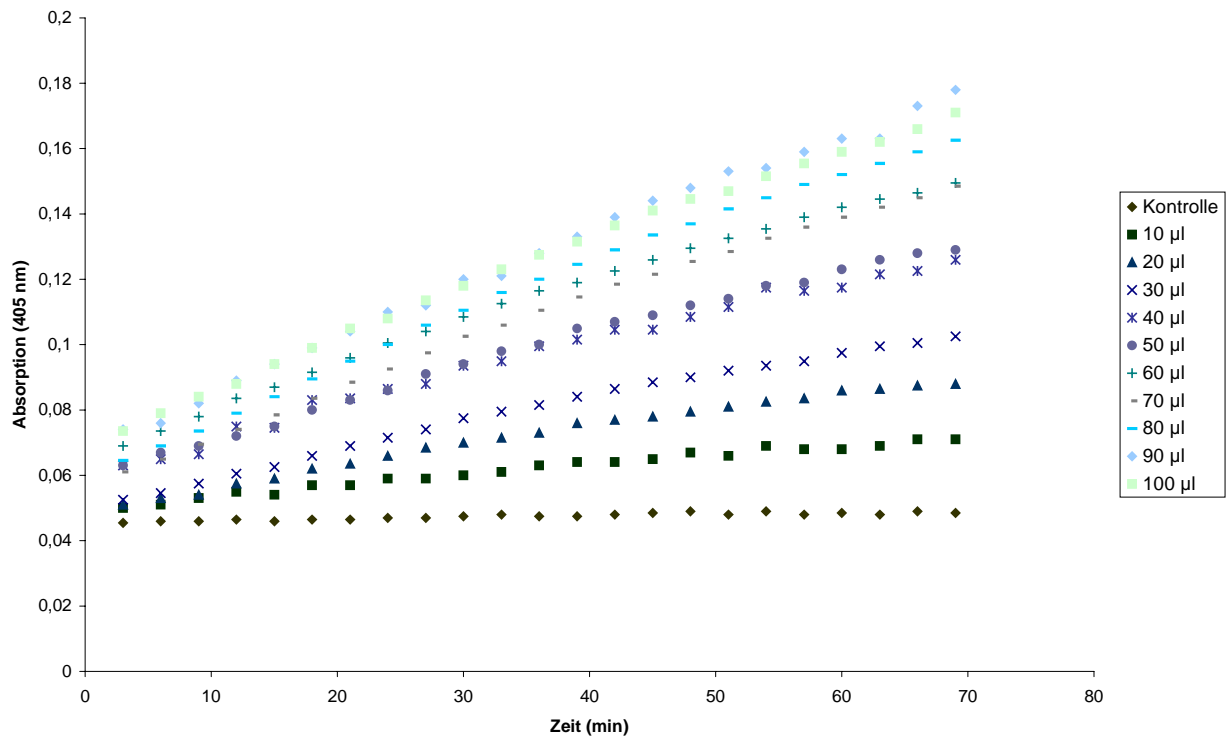


Abb. 6: Methodenetablierung; konstante Enzymmenge (100 U/ml), variable Substratmenge (PNPG7-Stammlösung mit 10 mg/ml)

Aus diesen Vorversuchen ergaben sich Enzym- und Substratkonzentrationen, die einen nahezu linearen Reaktionsverlauf über das festgelegte Meßintervall zeigten.

Die festgelegten Konzentrationen erforderten eine weitere Anpassung auf das Substrat p-Nitrophenyl- α -D-maltopentaosid (PNPG5).

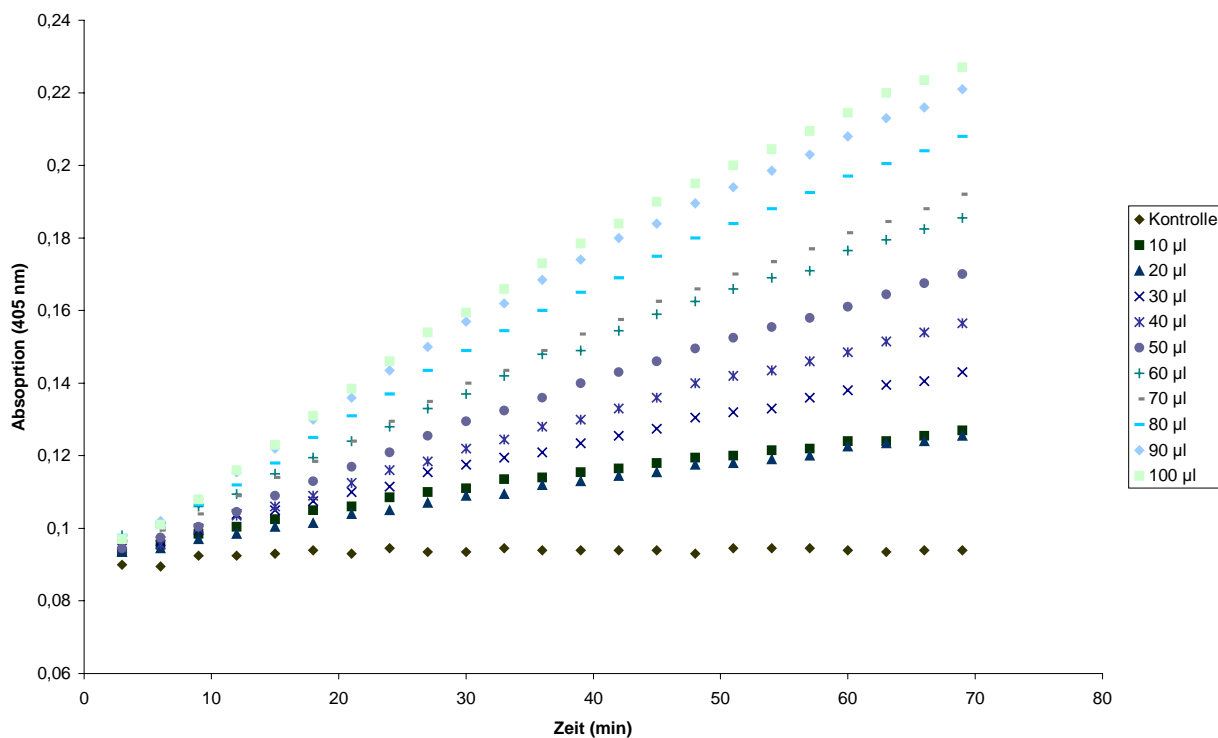


Abb. 7: Methodenetablierung; konstante Substratmenge (PNPG5: 24 mg/ml), variable Enzymmenge (Enzymstammlösung mit 100 U/ml)

Mit diesem Substrat wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen gearbeitet. Beobachtungen bei den Vorversuchen zeigten, dass die Randkavitäten in den 96-well-Platten störanfällig waren. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden diese daher nicht mit Proben besetzt.

Die kinetischen Untersuchungen wurden in 96-well-Platten durchgeführt. Alle Reagenzien wurden (sofern im Versuchsteil nicht anders angegeben) in Puffer gelöst (HEPES 50 mM, pH = 7,1). 50 µl Substratlösung (PNPG5, 25 mM) und die Testlösungen (jeweils 10/25/50/75/100 µl) wurden in die wells pipettiert. Puffer (HEPES, 50 mM, pH 7,1) wurde zu einem Volumen von 150 µl zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zusatz der Enzymlösung (50 µl Pankreas- α -Amylase vom Schwein in Puffer, 100 U/ml) gestartet.

Die Absorption wurde in 3-min-Intervallen über 30/60/90 min bei 37°C gemessen. Messparameter war der Anstieg der Absorption über die Zeit. Alle Assays wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt. Die Bestimmung der Hemmung erfolgte über lineare Regression und Vergleich der Anstiege der Geraden.

Zur Kontrolle wurde die Absorption aller Untersuchungslösungen ohne Substrat- und Enzymlösung über den Messzeitraum verfolgt und als Grundabsorption vom eigentlichen Messwert abgezogen.

Wurde als Lösungsmittel ein anderes als Puffer eingesetzt, wurde vorher ermittelt, welche Konzentrationen die Aktivität des Enzyms nicht beeinflussen, eine entsprechende Kontrolle wurde mitgeführt.

Die Rangordnung der hemmenden Wirkung gegenüber α -Glukosidasen ist bei Acarbose Amylase > Saccharase > Maltase > Isomaltase (Neye, 2002), so dass Acarbose aufgrund dieser Affinität als Positivkontrolle ausgewählt wurde.

Für das Screening des afrikanischen Pflanzenmaterials wurden jeweils 0,5 g des getrockneten, zerkleinerten Pflanzenmaterials mit 2500 μ l Puffer (50 mM HEPES, pH = 7,1) bzw. einer Mischung aus 250 μ l i-Propanol und 2250 μ l Puffer (50 mM HEPES, pH = 7,1) 20 Minuten bei Raumtemperatur extrahiert.

Für die Untersuchungen des übrigen Pflanzenmaterials wurden Pufferextrakte bzw. Presssäfte eingesetzt. Für die Gewinnung des Pufferextraktes wurden 0,5 g Droge mit 2500 μ l Puffer (50 mM HEPES, pH = 7,1) 20 Minuten bei Raumtemperatur extrahiert. Die Presssäfte wurden entweder gekauft oder durch Zentrifugation (5 min bei 15000 g) des stark zerkleinerten Pflanzenmaterials gewonnen.

Sofern im Ergebnisteil nicht anders dargestellt, wurden 10/50/100 μ l des jeweiligen Extraktes im Screening untersucht. Für den Vergleich und die Einstufung der Hemmaktivität wurde jeweils der Effekt von 50 μ l herangezogen.

2.3.2 Analytische Untersuchungen zur Artischocke

Die durchgeführten analytischen Untersuchungen umfaßten neben der fraktionierten Extraktion Untersuchungen mittels HPLC und DC. Da eine eindeutige Identifizierung der Inhaltsstoffe über diese Methoden gelang, wurde auf weitere Methoden (z.B. NMR) verzichtet.

2.3.2.1 *Fraktionierte Extraktion von Cynarae herba*

Die fraktionierte Extraktion erfolgte nach folgendem Schema:

Extraktionsschema:

(1) n-Hexan

- 10 g Droge + 400 ml n-Hexan, 3 h extrahiert (Soxhlet)
- Extrakt verworfen
- Droge getrocknet

(2) Dichlormethan

- getrocknete Droge aus (1) + 400 ml CH₂Cl₂, 3 h extrahiert (Soxhlet)
- 1 ml Extrakt zum Testen eingedampft, in 1 ml DMSO aufgenommen, getestet
- Extrakt einrotiert
- Droge getrocknet

(3) Ethanol

- getrocknete Droge aus (2) + 100 ml EtOH 70%v/v, zugedeckt
- 0,5 h Magnetprüher, 1 h Ultraschallbad, 1 h Magnetprüher
- Extrakt zum Testen
- Droge getrocknet

(4) Puffer

- getrocknete Droge aus (3) + 100 ml Puffer (HEPES, 50mM, pH = 7,1)
- 0,5 h Magnetprüher, 1 h Ultraschallbad, 1 h Magnetprüher
- Extrakt zum Testen

2.3.2.2 Untersuchungen mittels HPLC

Die Untersuchungen mittels HPLC erfolgten nach folgendem HPLC-Protokoll:

Stationäre Phase:

HPLC-Säule LiChrospher[®] 100 RP-8 (5 µm) [4 x 125 mm]

HPLC-Säule LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm) [4 x 125 mm]

Mobile Phase:

A: Acetonitril + 2% Essigsäure

B. Aqua dest. + 2% Essigsäure

Gradient:

0 – 5 min: 5% A

5 – 8 min: 5 → 15% A

8 – 12 min: 15 → 25% A

15 – 18 min: 25 → 30% A

20 – 22 min: 30 → 33% A

22 – 25 min: 33 → 35% A

25 – 30 min: 35 → 40% A

30 – 35 min: 40 → 45% A

40 – 45 min: 45 → 5% A

50 min: Stop

Flußrate:

1,2 ml/min

Aufgabevolumen:

20 µl

Detektion:

UV-Spektrum 280 nm

UV-Spektrum 350 nm

2.3.2.3 Untersuchungen mittels DC

Die Untersuchungen mittels DC erfolgten nach folgendem Schema:

Stationäre Phase:

DC-Alufolien RP-18 F_{254S} 20x20 cm, Schichtdicke 200 µm, Laufstrecke 100 mm

Mobile Phase:

Acetonitril – Wasser (je + 2% Essigsäure) 30-70% (v/v)

Detektion:

1) UV 254 nm

Die Platte wurde unter UV-Licht 254 nm ausgewertet.

2) UV 366 nm

Die Platte wurde unter UV-Licht 366 nm ausgewertet.

3) Naturstoffreagenz/PEG

Auf die DC-Platte wurden nacheinander eine 1%ige methanolische Lösung von Diphenylborsäure-β-ethylaminoester (Naturstoffreagenz) und eine 5%ige ethanolische Polyethylenglykol-4000-Lösung (PEG) aufgesprüht. Anschließend wurde bei Tageslicht, bei 254 nm und bei 366 nm ausgewertet.

2.3.3 Enzym-Match-Untersuchungen

Die Untersuchungen zu möglichen Angriffspunkten potentieller Enzyminhibitoren am Molekül wurden am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie von Dr. G. Krause durchgeführt. Dabei wurde computergestützt überprüft, wo im Enzymmolekül ein möglicher Angriffspunkt für potentielle polyphenolische α -Amylase-Inhibitoren sein könnte.

2.3.4 Blutzuckeruntersuchungen

Die Blutzuckeruntersuchungen erfolgten am Morgen nach vorangegangenem Fasten über Nacht. Grundlage zur Durchführung der Untersuchungen war eine definierte, stärkehaltige Kost, die in diesem Versuchsmodell durch 100 Gramm Vollkorntoast dargestellt wurde. Der Nüchtern-Blutzucker wurde durch die Probanden zunächst vor dem Essen bestimmt. Weitere Messungen erfolgten 10, 30, 50 und 70 min nach dem Essen.

Es wurden pro Proband drei Testreihen mit mindestens 3 Wiederholungen durchgeführt:

- Testreihe 1: Kontrollblutzuckerbestimmung
- Testreihe 2: Blutzuckerbestimmung nach Kapseleinnahme
- Testreihe 3: Blutzuckerbestimmung nach Acarbose-Einnahme

Testreihe 1 diente der Aufzeichnung der normalen, unbeeinflussten Blutzuckerkurve. Testreihe 2 war die eigentliche Versuchsreihe. Nachdem der Proband seinen Nüchternblutzucker bestimmt hat, nahm er zwei Test-Kapseln (Artischocken-Spezial Extrakt, 100 mg/Kapsel; Lichtwer Pharma GmbH) mit Wasser ein. Die Einnahme erfolgte im Durchschnitt 10 min vor dem Essen. Testreihe 3 diente als Postivkontrolle, 50 mg Acarbose (Glucobay®) wurden nach der Bestimmung des Nüchternblutzuckers nach Anweisung in der Packungsbeilage mit dem ersten Bissen der Nahrung eingenommen.