

### 3 Untersuchungen und Ergebnisse

#### 3.1 Pflanzenscreening

##### 3.1.1 Screening der afrikanischen Pflanzen

Die Herstellung der Extrakte und das Pflanzenscreening erfolgte nach der unter 2.3.1 beschriebenen Methode. Getestet wurden 10/50/100  $\mu$ l des jeweiligen Extraktes. Für den Vergleich und die Einstufung der Hemmaktivität wurde jeweils der Effekt von 50  $\mu$ l herangezogen.

Tab. 5: Einfluss der afrikanischen Pflanzen auf die  $\alpha$ -Amylase-Aktivität

Pflanze	Kaltpufferextrakt		i-Propanol-Puffer-Extrakt	
	Extraktgehalt (mg/ml)	Hemmung	Extraktgehalt (mg/ml)	Hemmung
<i>Acacia nilotica</i> (L.) Willd. ex Delile Stammrinde	20,2	+++	51,9	+++
<i>Acacia nilotica</i> (L.) Willd. ex Delile Wurzelrinde	44,2	+++	30,9	+++
<i>Afzelia africana</i> Sm. ex Pers. Stammrinde	4,2	-		
<i>Ampelocissus africana</i> (Lour.) Merr. Oberirdische Teile	25,2	-		
<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr. Blätter	86,7	-		

<i>Anogeissus leiocarpus</i> (DC.) Guill. & Perr. Wurzelrinde	45,2	-		
<i>Balanites aegyptiaca</i> (L.) Del. Pflanze	35,9	-		
<i>Balanites aegyptiaca</i> (L.) Del. Stammrinde	12,4	+++	19,7	+++
<i>Balanites aegyptiaca</i> (L.) Del. Wurzeln	63,0	-		
<i>Bauhinia reticulata</i> DC. Blätter	24,8	+++	31,9	++
<i>Boscia angustifolia</i> A. Rich. Stammrinde	8,8	-		
<i>Boscia angustifolia</i> A. Rich. Blätter und Zweige	29,6	-		
<i>Cassia sieberiana</i> DC. Wurzel	21,6	++	16,9	+
<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn. Stammrinde	6,0	+	20,9	+

<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn. Wurzelrinde	8,8	+	15,5	+
<i>Cissus quadrangularis</i> L. Blätter	39,8	+		
<i>Cochlospermum tinctorium</i> A.Rich. Wurzeln	29,3	+	65,3	+
<i>Combretum glutinosum</i> Perr. ex DC. Stammrinde	21,6	++	5,6	-
<i>Combretum micranthum</i> G. Don Blätter	18,2	++	36,9	+
<i>Diospyros mespiliformis</i> Hochst. ex A. DC. Blätter	14,2	+	51,5	+
<i>Entada africana</i> Guill. & Perrott. Wurzeln	4,4	++	21,7	++
<i>Ficus iteophylla</i> Miq. Blätter	18,8	-		
<i>Gardenia triacantha</i> DC. Wurzeln	22,2	+	8,5	-

<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel Blätter	5,3	+	31,1	+
<i>Guiera senegalensis</i> J.F.Gmel Wurzeln	0,4	-		
<i>Holarrhena floribunda</i> G.Don Blätter	25,4	+	53,3	+
<i>Khaya senegalensis</i> Desr (A.Juss) Stammrinde	23,2	++	37,0	+
<i>Lawsonia alba</i> Lam. Blätter und Zweige	28,6	++	27,9	++
<i>Lannea microcarpa</i> Engl. & Krause Blätter	2,2	+	33,5	+
<i>Lannea microcarpa</i> Engl. & Krause Stammrinde	33,6	+++	36,9	++
<i>Leptadenia hastata</i> (Pers.)Dec'ne. Oberirdische Teile	30,2	-		
<i>Loranthus pentagonia</i> DC. Pflanze	20,6	-		

<i>Maytenus senegalensis</i> (Lam.) Exell. Blätter	19,6	+	39,7	-
<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) O. Kuntze Blätter	16,5	++		+++
<i>Mitragyna inermis</i> (Willd.) O. Kuntze Stammrinde	37,6	-		
<i>Opilia celtidifolia</i> (Guill. & Perr.) Endl. ex Walp. Blätter und Zweige	5,6	-		
<i>Parinari curatellifolia</i> Planch. ex Benth. Blätter	34,0	++	33,1	++
<i>Parinari curatellifolia</i> Planch. ex Benth. Stammrinde	2,0	-	13,5	+
<i>Securidaca</i> <i>longepedunculata</i> Fers. Wurzeln	13,4	-		
<i>Sterculia tomentosa</i> Guill. & Perr. Stammrinde	21,2	-		

<i>Sterculia tomentosa</i> Guill. & Perr. Wurzeln	1,8	-		
<i>Strychnos spinosa</i> Lam. Wurzeln	9,7	-		
<i>Tamarindus indica</i> L. Blätter	8,8	+++	36,5	+++
<i>Terminalia avicenoides</i> Guill. & Perr. Stammrinde	3,4	-		
<i>Terminalia avicenoides</i> Guill. & Perr. Wurzelrinde	18,2	-		
<i>Terminalia avicenoides</i> Guill. & Perr. Blätter	25,6	-		
<i>Trichilia emetica</i> Vahl. Stammrinde	23,8	+	39,7	+

-	Enzymhemmung < 20%
+	Enzymhemmung 20 – 45%
++	Enzymhemmung 45 – 75%
+++	Enzymhemmung > 75%

### 3.1.2 Screening der weiteren Pflanzen

Die Herstellung der Extrakte und das Pflanzenscreening erfolgte nach der unter 2.3.1 beschriebenen Methode. Getestet wurden 10/50/100 µl des jeweiligen Extraktes bzw. Presssaftes. Für den Vergleich und die Einstufung der Hemmaktivität wurde jeweils der Effekt von 50 µl herangezogen.

Tab. 6: Einfluss der weiteren Pflanzen auf die  $\alpha$ -Amylase-Aktivität

Pflanze	Extraktgehalt (mg/ml)	Hemmung
<i>Cinnamomum verum</i> J.S.Presl.		
Rinde	3,6	-
<i>Cynara cardunculus</i> L. ssp. <i>flavescens</i> Winkl.		
Blütenknospen- Presssaft	107	+++
Kraut	46,4	++
<i>Galega officinalis</i> L.		
Kraut	17,6	-
<i>Malus domestica</i> Borkh.		
Presssaft der Früchte	118,8	+++
<i>Melissa officinalis</i> L.		
Blätter	23,5	++
<i>Momordica foetida</i> Schumach.		
Blätter	53,8	++
<i>Morus alba</i> L.		
Presssaft der Früchte	170,6	-
Blätter	46,3	-

<i>Morus rubra</i> L.			
	Presssaft der Früchte	109,8	++
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.			
	Pericarp	11,6	++
<i>Pyrus communis</i> L.			
	Presssaft der Früchte	120,3	+++
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.			
	Blätter	14,4	++
<i>Salvia officinalis</i> L.			
	Blätter	4,3	-
<i>Taraxacum officinale</i> Web. ex Wigg.			
	Kraut mit Wurzel	45,4	+
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.			
	Samen	8	-
<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC			
	Rinde	14,4	-
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.			
	Blätter	41,8	+++

- Enzymhemmung < 20%
- + Enzymhemmung 20 – 45%
- ++ Enzymhemmung 45 – 75%
- +++ Enzymhemmung > 75%

Zusätzlich wurden von ausgewählten Drogen Heißpufferextrakte, die die Zubereitung eines Tees nachahmen sollten angefertigt. Eine ausgeprägte Aktivitätssteigerung von 7% auf 35% war dabei nur bei der Geißraute zu beobachten. Die Extraktion mit kaltem Puffer wurde deshalb als Standard beibehalten.



Trockenextrakte standen von folgenden Pflanzen zur Verfügung und wurden in den dargestellten Konzentrationen getestet.

Tab. 7: untersuchte Trockenextrakte

Pflanze	Konzentration (Lösungsmittel)	Hemmung
<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze		
Blatt-Trockenextrakt	10 mg/ml (Puffer)	++
<i>Cynara cardunculus</i> L. ssp. <i>flavescens</i> Winkl.		
Hydrophiler Extrakt	10 mg/ml (Puffer)	+
Lipophiler Extrakt	10 mg/ml (DMSO)	+
Königs-Artischockenextrakt (Spezial-Extrakt)	10 mg/ml (Puffer)	++
<i>Ononis spinosa</i> L.		
Wurzel-Trockenextrakt	10 mg/ml (Puffer)	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.		
Pericarp-Trockenextrakt	10 mg/ml (Puffer)	++

- Enzymhemmung < 20%
- +           Enzymhemmung 20 – 45%
- ++          Enzymhemmung 45 – 75%
- +++        Enzymhemmung > 75%

## 3.2 Untersuchungen zur Artischocke

Da die Untersuchungen zeigten, dass Artischockenzubereitungen ein vergleichsweise hohes Potential aufwiesen, die  $\alpha$ -Amylase-Aktivität zu hemmen, sollte diese Pflanze in weiterführenden Untersuchungen genauer charakterisiert werden. Die Artischocke zählt heutzutage zu den wichtigen Arzneipflanzen. Bereits in der Antike war sie bekannt, wurde jedoch damals kaum medizinisch verwendet, sondern war als seltenes Gemüse eher den begüterten Kreisen vorbehalten. Allerdings waren ihre verdauungsfördernden Eigenschaften bereits bekannt.

### 3.2.1 Fraktionierte Extraktion von *Cynarae herba*

Nachdem sich gezeigt hatte, dass Artischocken-Zubereitungen ein hohes Potenzial besitzen, die  $\alpha$ -Amylase-Aktivität zu hemmen, sollte untersucht werden, in welcher Fraktion des Extraktes die aktiven Komponenten zu finden sind. Dazu wurde eine fraktionierte Extraktion nach dem unter 2.3.2.1 dargestellten Schema durchgeführt.

Der erste Extraktionsschritt diente der Abtrennung des Chlorophylls. Die Extrakte, die aus den Extraktionsschritten 2, 3 und 4 gewonnen wurden, wurden auf ihre Beeinflussung der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität getestet. Dabei zeigte sich, dass der lipophile Extrakt das Enzym nicht beeinflusste; auf eine Darstellung der Werte wurde verzichtet. Eine Enzymhemmung konnte sowohl durch den ethanolischen als auch durch den Pufferextrakt festgestellt werden.

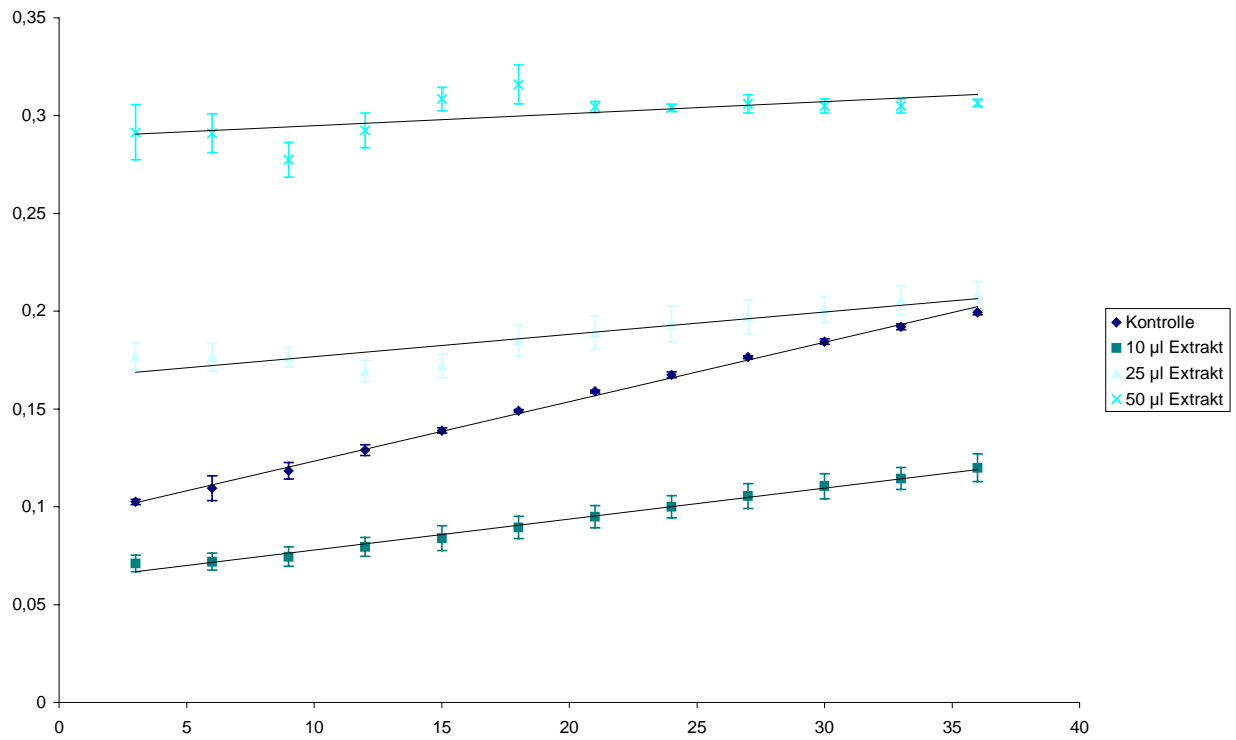


Abb. 8: Beeinflussung der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität durch den ethanolischen Extrakt;  $n \geq 4$ , Mittelwerte  $\pm$  SD

	Anstieg der Geraden	Aktivität in %	Hemmung in %
Kontrolle	0,003	100	0
10 µl Extrakt	0,0016	53,3	46,7
25 µl Extrakt	0,0011	36,7	63,3
50 µl Extrakt	0,0006	20	80

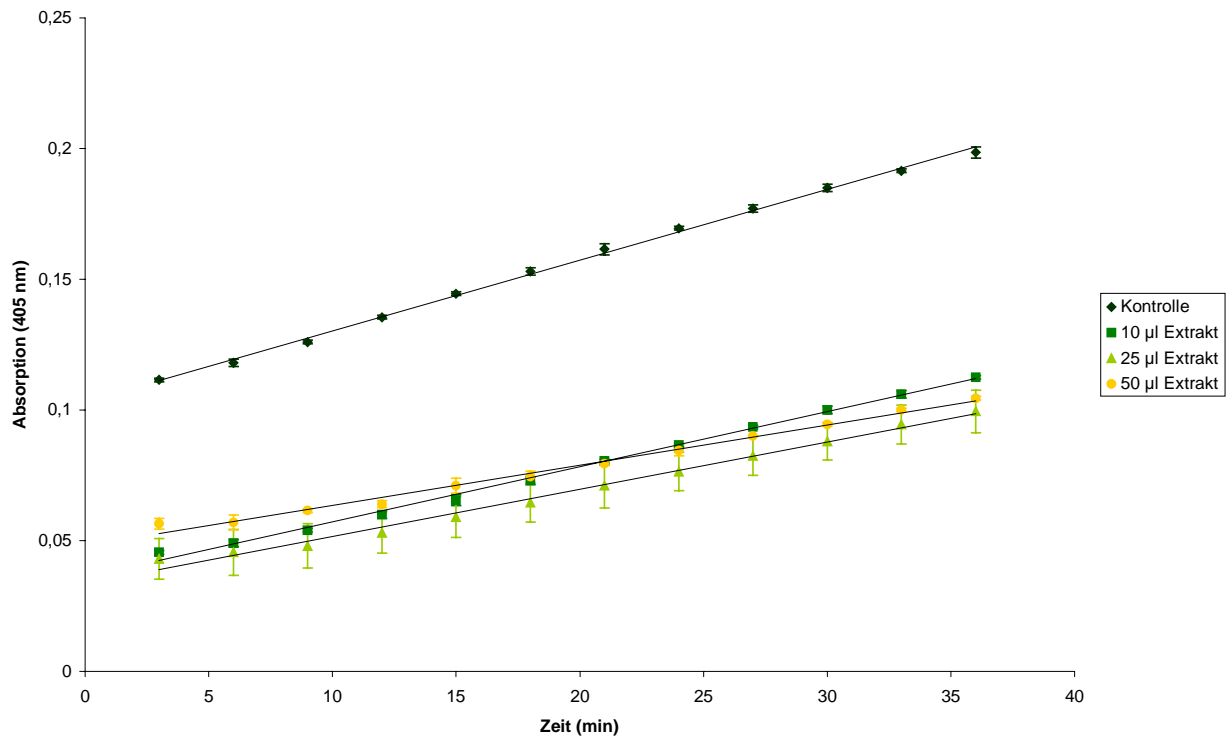


Abb. 9: Beeinflussung der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität durch den Puffer-Extrakt;  $n \geq 4$ , Mittelwerte  $\pm$  SD

	Anstieg der Geraden	Aktivität in %	Hemmung in %
Kontrolle	0,0029	100	0
10 $\mu$ l Extrakt	0,0021	72,4	27,6
25 $\mu$ l Extrakt	0,0018	62,1	37,9
50 $\mu$ l Extrakt	0,0015	51,7	48,3

Vergleicht man die  $\alpha$ -Amylase-Hemmungen, die durch 25  $\mu$ l der Extrakte hervorgerufen werden, so liegt die Hemmung durch den ethanolischen Extrakt bei 63,3%, beim Pufferextrakt bei 37,9%, während der Dichlormethanextrakt keine Hemmung der Enzymaktivität zeigte. Daher konnte abgeleitet werden, dass die aktive Fraktion durch hydrophile Substanzen gebildet wird.

### 3.2.3 Analytische Untersuchungen zur Artischocke

Der Nachweis der Inhaltsstoffe im weiter verwendeten Untersuchungsmaterial erfolgte mittels Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) und Dünnschichtchromatographie (DC).

### 3.2.3.1 Identifizierung mittels HPLC

Die Durchführungen der HPLC-Untersuchungen erfolgte nach dem unter 2.3.2.2 dargestellten HPLC-Protokoll. Um die Reinstoffe im Königsartischockenextrakt nachzuweisen, wurden sowohl Spektren der Reinstoffe als auch kombinierte Spektren aus Königsartischocke und Reinstoff aufgenommen.

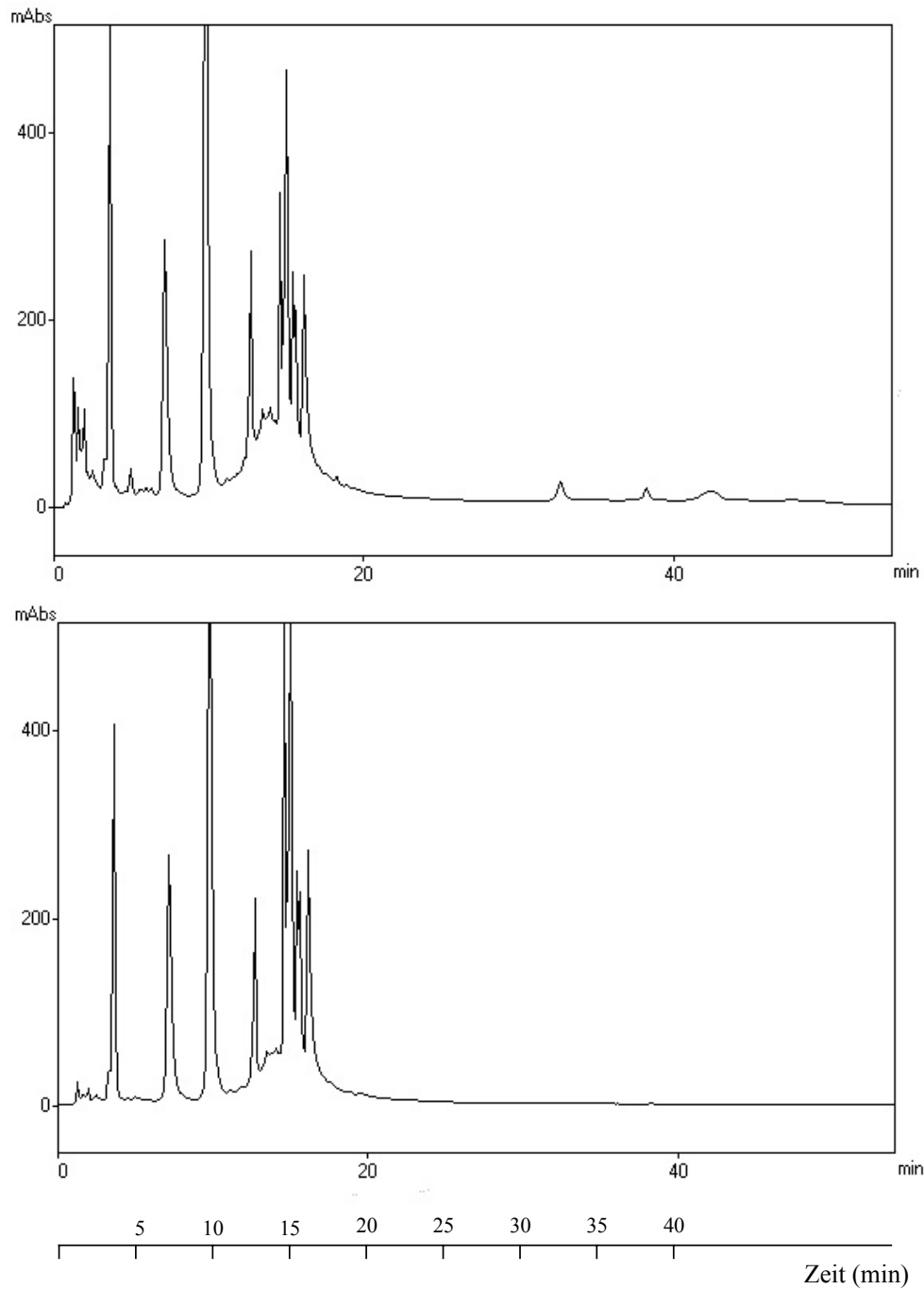


Abb. 10: HPLC-Chromatogramm der Königsartischocke, Spektrum bei 280 nm (oben) und bei 350 nm (unten)/RP8-Säule

Tab. 8: Zuordnung der Vergleichssubstanzen RP8-Säule

Retentionszeit an der RP8-Säule (min)	Identifizierte Substanz
1,1	Apigenin
1,4	Quercetin
2,0	Luteolin
5,8	Aesculin
9,7	Kaffeensäure
12,5	Chlorogensäure
13,9	Scopoletin
14,5	Rutin
15,3	Hesperidin
16,0	Isochlorogensäure
17,4	Apigenin-7-glucosid

Über die Änderung der Peakhöhe und Peakfläche bei gleicher Retentionszeit, konnten die Reinstoffe identifiziert werden.

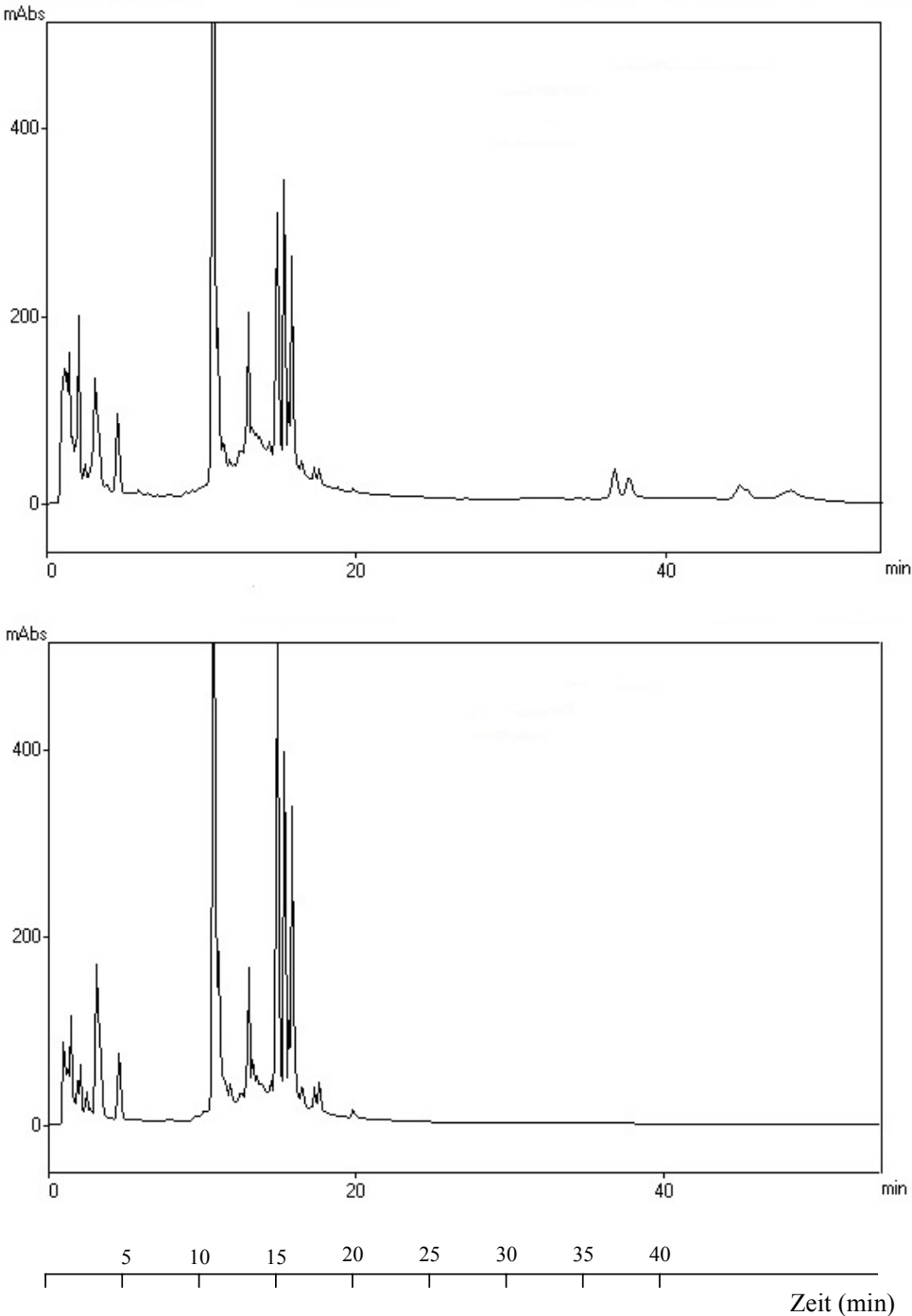


Abb. 11: HPLC-Chromatogramm der Königsartischocke, Spektrum bei 280 nm (oben) und bei 350 nm (unten)/RP18-Säule

Tab. 9: Zuordnung der Vergleichssubstanzen RP18-Säule

Retentionszeit an der RP18-Säule (min)	Identifizierte Substanz
10,7	Chlorogensäure
11,4	Kaffeesäure
14,4	Luteolin-7-glucosid
14,9	Isochlorogensäure
15,3	Isochlorogensäure
15,8	Isochlorogensäure
19,6	Luteolin



### 3.2.3.2 Identifizierung mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Ein etabliertes DC-Trennsystem für *Cynarae herba* ist die Trennung auf Kieselgel 60-Platten unter Verwendung von Ethylacetat-Ameisensäure-Eisessig-Wasser (100:11:11:27) als mobile Phase (Wagner et al., 1983). Dieses System erwies sich jedoch als nicht effektiv genug, so dass nach Optimierung das unter 2.3.2.3 beschriebene System zur Anwendung kam.

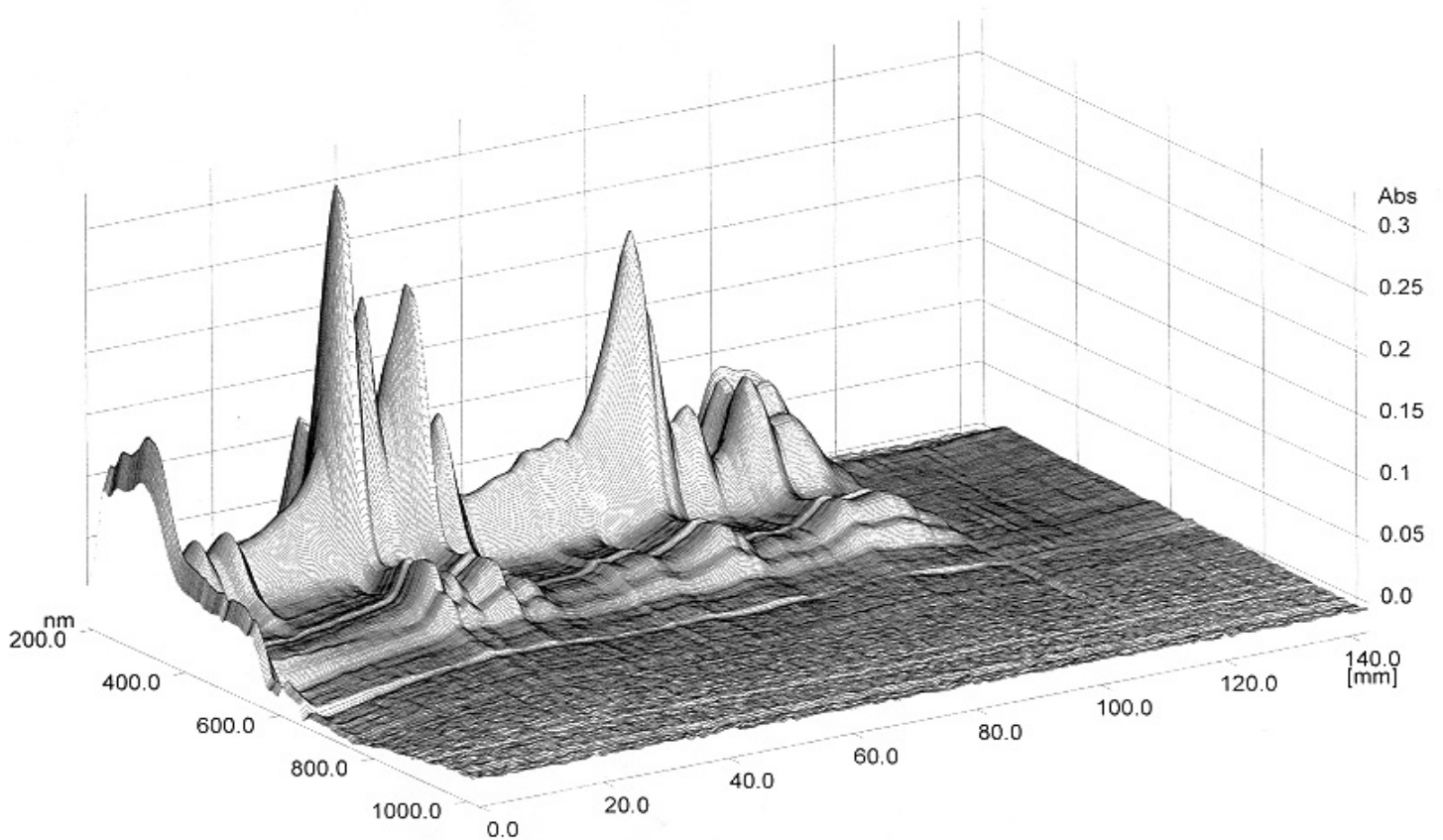


Abb. 12: 3D-Dünnschichtchromatogramm der Königsartischocke (Extrakt in Wasser)

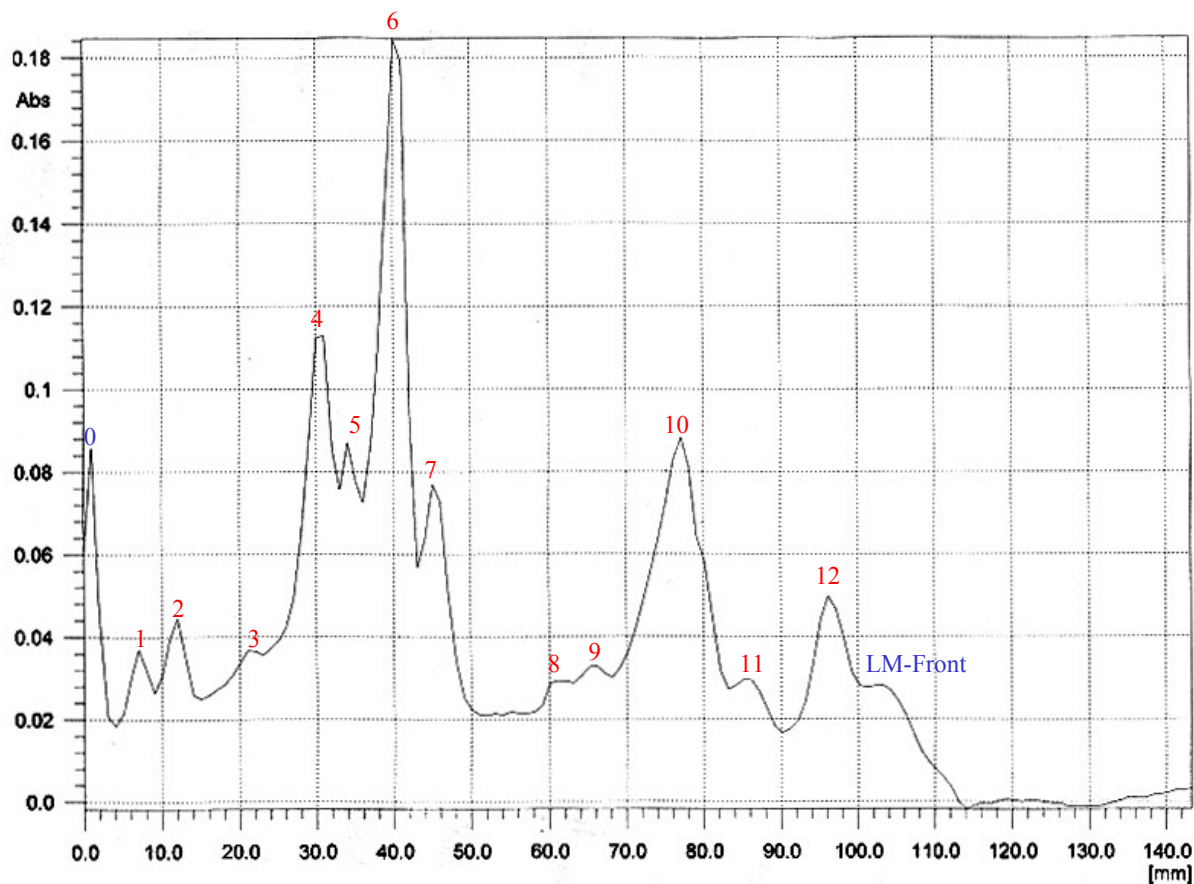
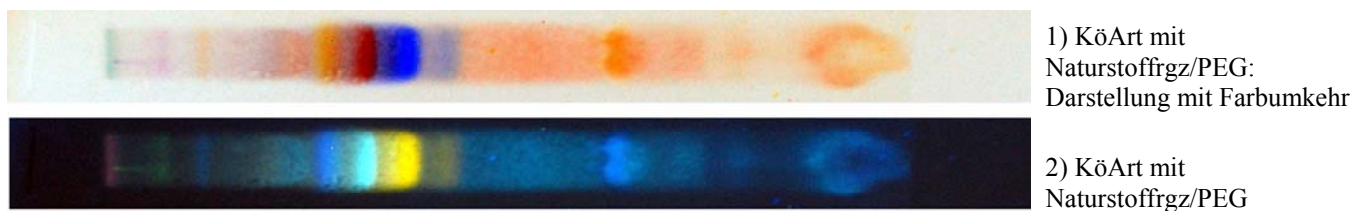


Abb. 13: 2-dimensionale Abbildung der Dünnschichtchromatographie der Königsartischocke

Um alle Peaks zu erfassen, wurde der Start des Scanvorgangs kurz vor den Auftragepeak gelegt. Nach Korrektur der Laufhöhen um den sich daraus ergebenden Differenzbetrag ergeben sich folgende Werte:

Tab. 10: Darstellung der Laufhöhe der Peaks der Königsartischocken-DC

Peak-Nummer	Laufhöhe	Peaknummer	Laufhöhe	Peaknummer	Laufhöhe
1	7 mm	5	33 mm	9	65 mm
2	11 mm	6	39 mm	10	76 mm
3	21 mm	7	44 mm	11	85 mm
4	29 mm	8	59 mm	12	95 mm

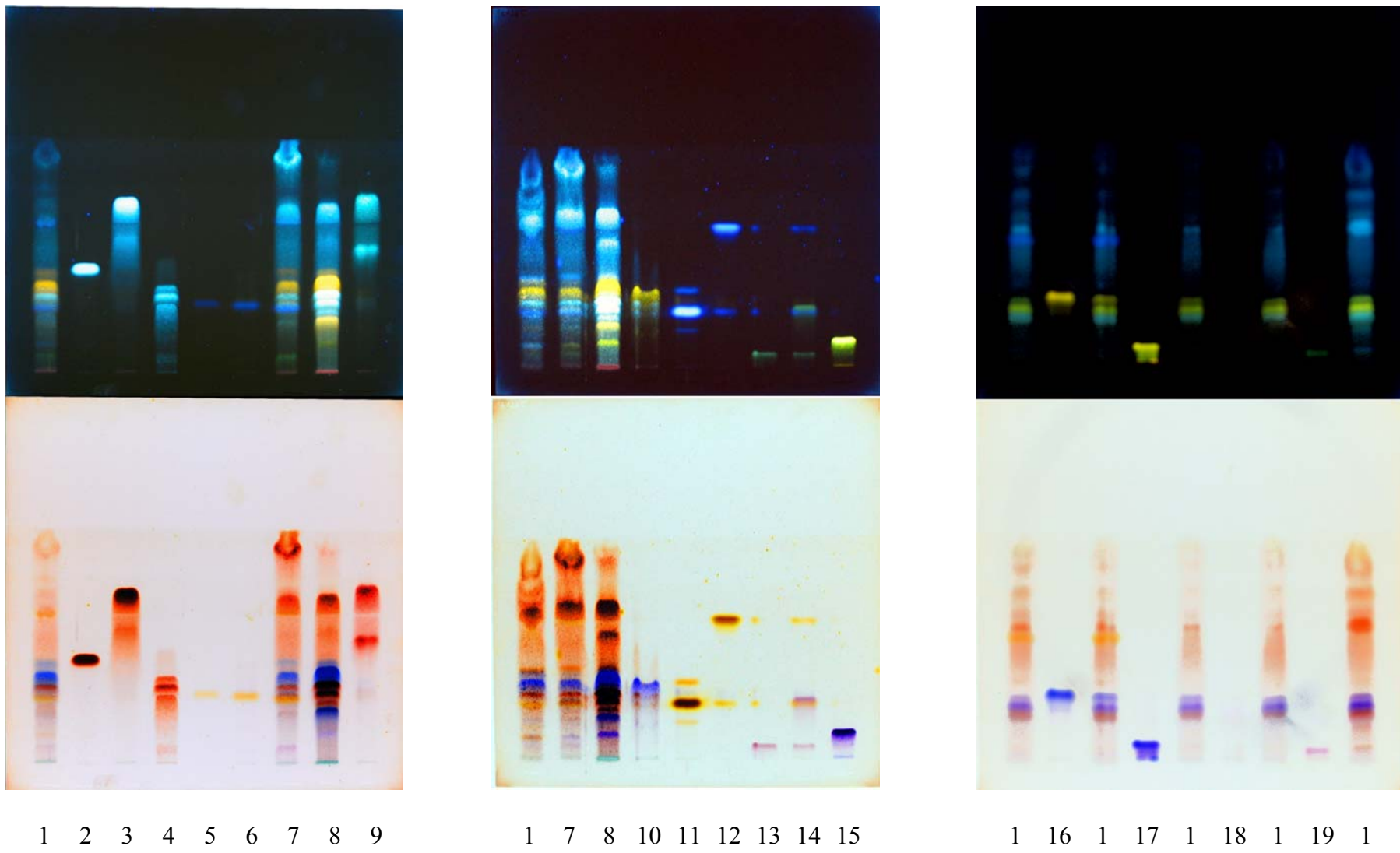


Abb. 14: DC der Artischockenextrakte mit Vergleichssubstanzen / Sprühreagenz: Naturstoffreagenz-PEG (Legende s. Tab 9)

Tab. 11: Aufgetragene Extrakte und Vergleichsubstanzen

Nummer	Substanz	Laufhöhe (Hauptpeak)
1	Königsartischocke	
2	Kaffeensäure	59 mm
3	Chlorogensäure	93 mm
4	Isochlorogensäure	44 mm
5	Ferulasäure	40 mm
6	Isoferulasäure	39 mm
7	Artischocke, hydrophil	
8	Artischocke, lipophil	
9	Cynarin	86 mm
10	Luteolin-7-glucosid	46 mm
11	Scopoletin	34 mm
12	Aesculin	77 mm
13	Apigenin	12 mm
14	Apigenin-7-glucosid	40 mm
15	Luteolin	21 mm
16	Rutin	37 mm
17	Quercetin	12 mm
18	Hesperidin	28 mm
19	Hesperetin	8 mm

Ein Vergleich der UV-Vis-Spektren der Peaks des Königsartischockenextraktes mit den Spektren der Vergleichsubstanzen gleicher Laufhöhen ist auf den folgenden Seiten dargestellt.

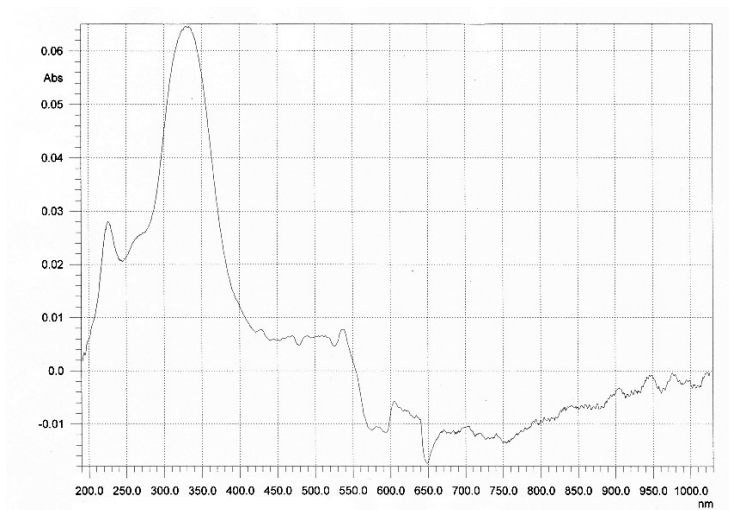


Abb. 15: UV-Vis-Spektrum Peak 1, Laufhöhe 7 mm

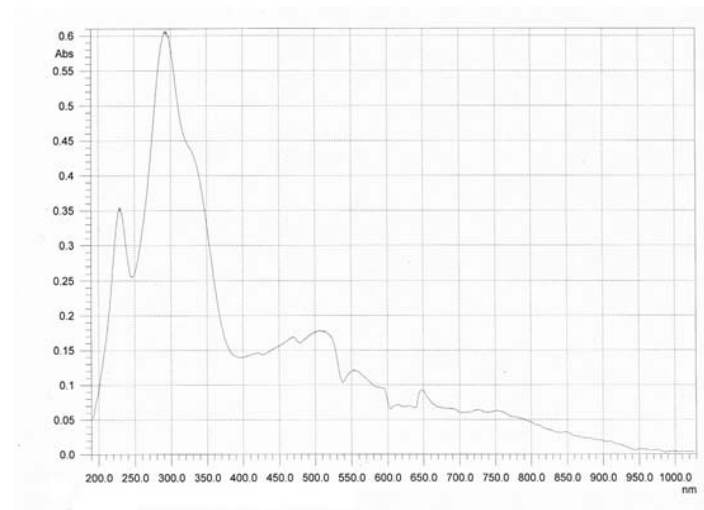


Abb. 16: UV-Vis-Spektrum Hesperetin, Laufhöhe 8 mm

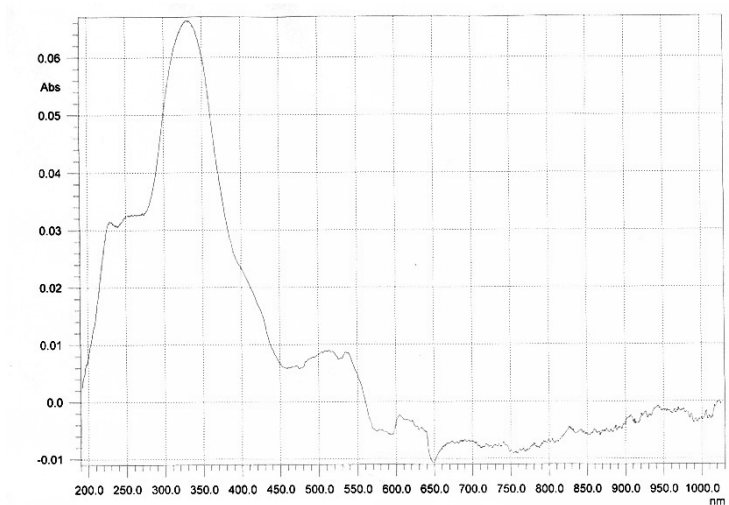


Abb. 17: UV-Vis-Spektrum Peak 2, Laufhöhe 11 mm

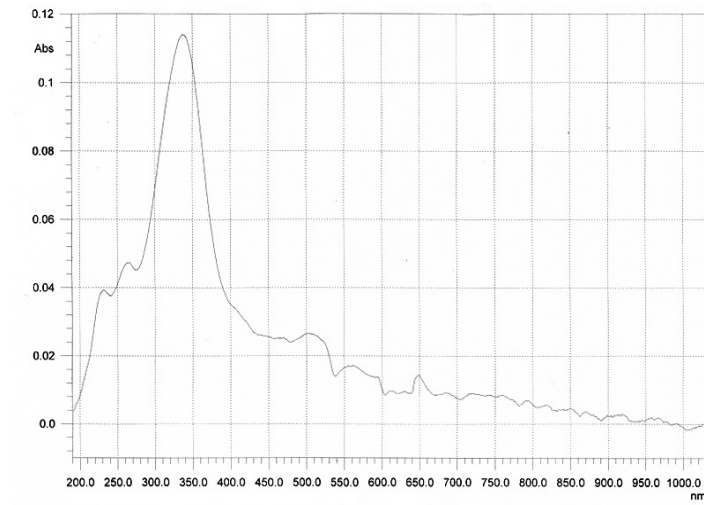


Abb. 18: UV-Vis-Spektrum Apigenin, Laufhöhe 12 mm

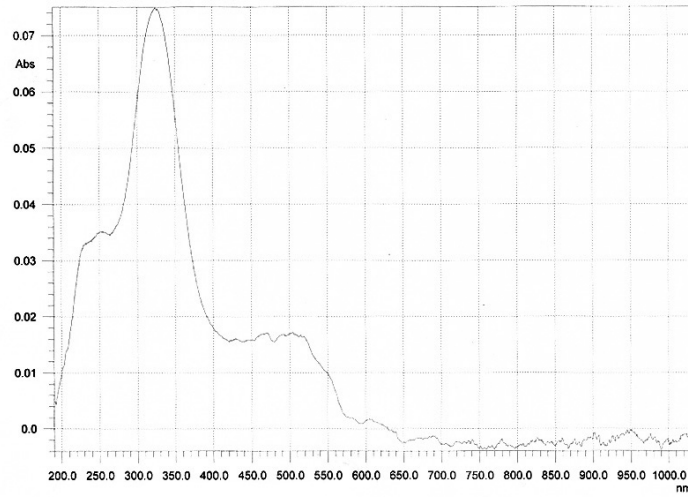


Abb. 19: UV-Vis-Spektrum Peak 3, Laufhöhe 21 mm

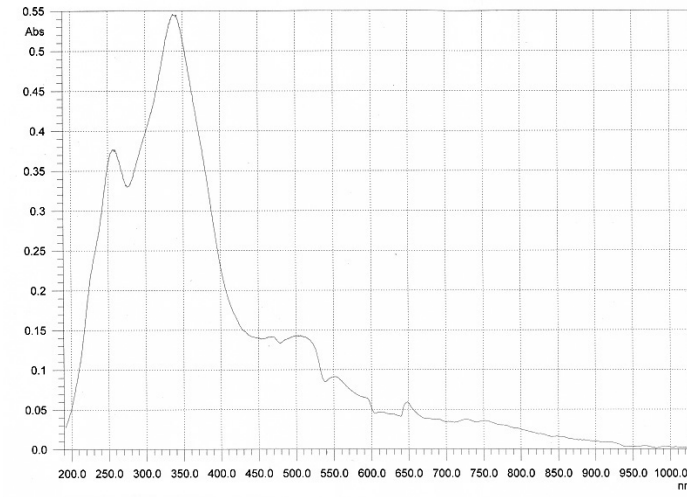


Abb. 20: UV-Vis-Spektrum Luteolin, Laufhöhe 21 mm

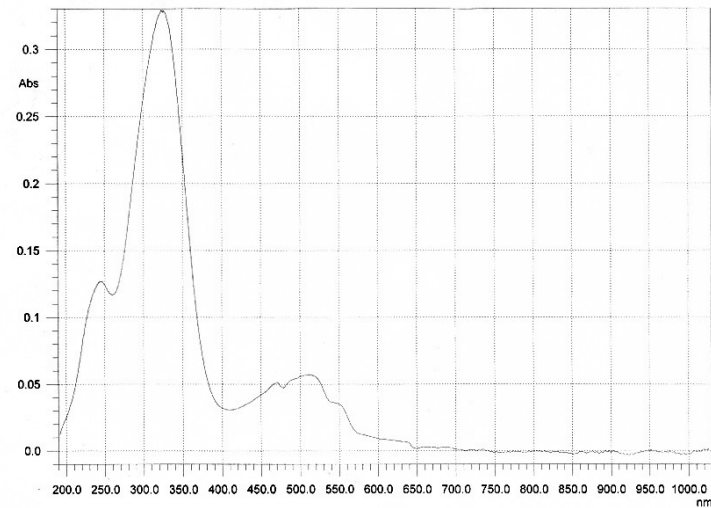


Abb. 21: UV-Vis-Spektrum Peak 4, Laufhöhe 29 mm

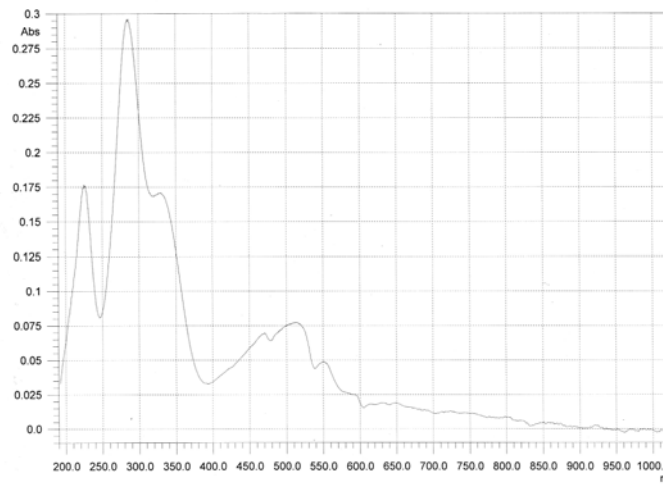


Abb. 22: UV-Vis-Spektrum Hesperidin, Laufhöhe 28 mm

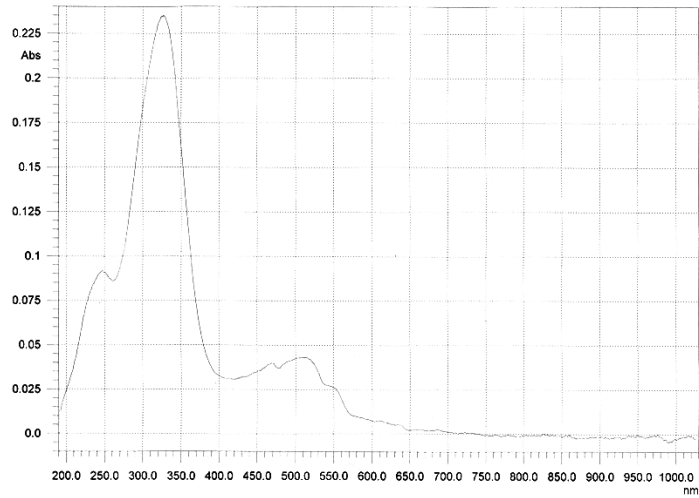


Abb. 23: UV-Vis-Spektrum Peak 5, Laufhöhe 33 mm

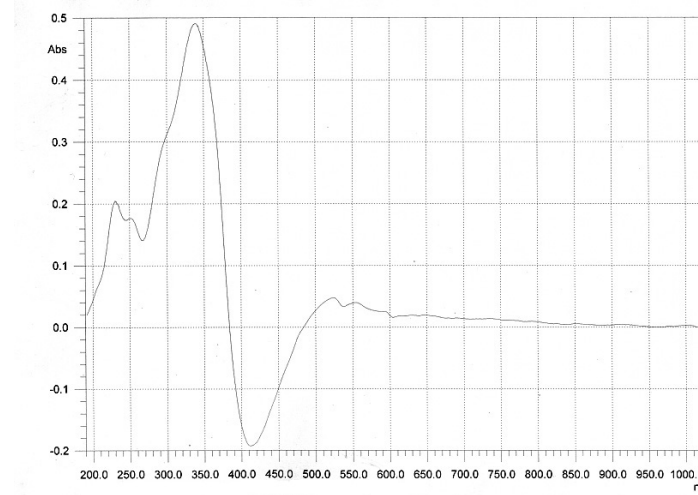


Abb. 24: UV-Vis-Spektrum Scopoletin, Laufhöhe 34 mm

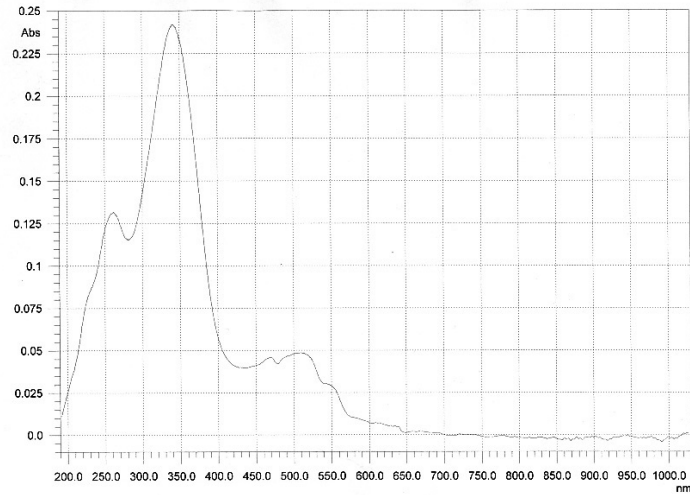


Abb. 25: UV-Vis-Spektrum Peak 6, Laufhöhe 39 mm

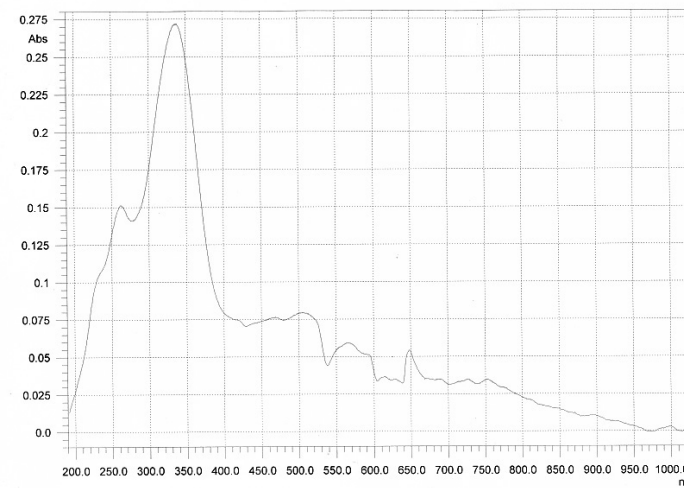


Abb. 26: UV-Vis-Spektrum Apigenin-7-glucosid, Laufhöhe 40 mm

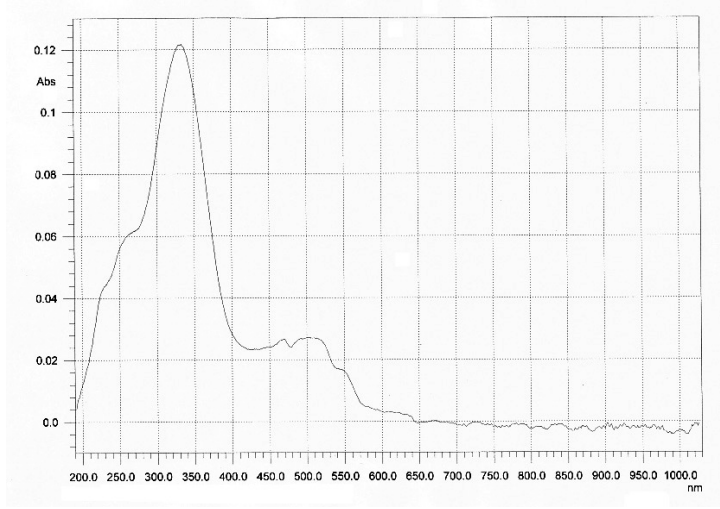


Abb. 27: UV-Vis-Spektrum Peak 7, Laufhöhe 44 mm

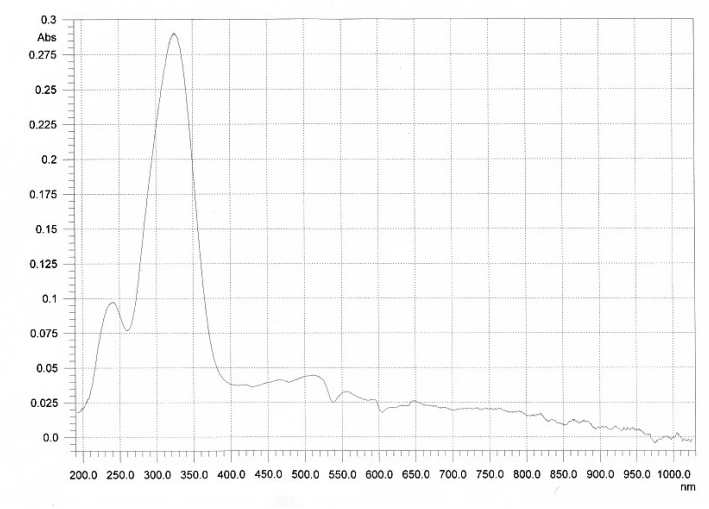


Abb. 28: UV-Vis-Spektrum Isochlorogensäure, Laufhöhe 44 mm

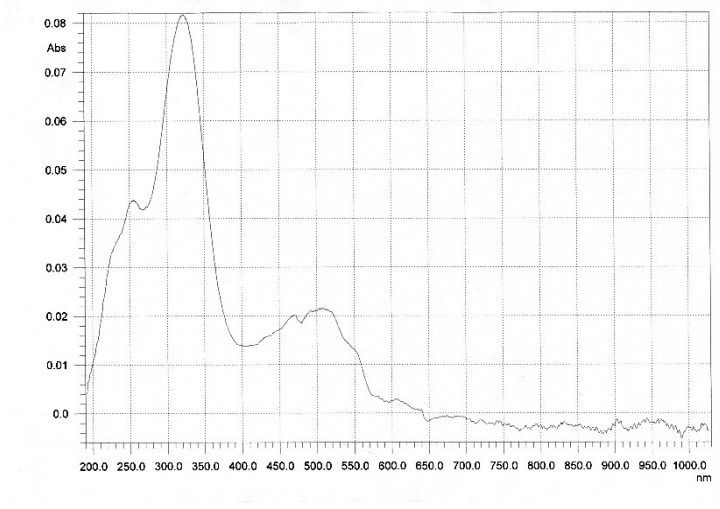


Abb. 29: UV-Vis-Spektrum Peak 8, Laufhöhe 59 mm

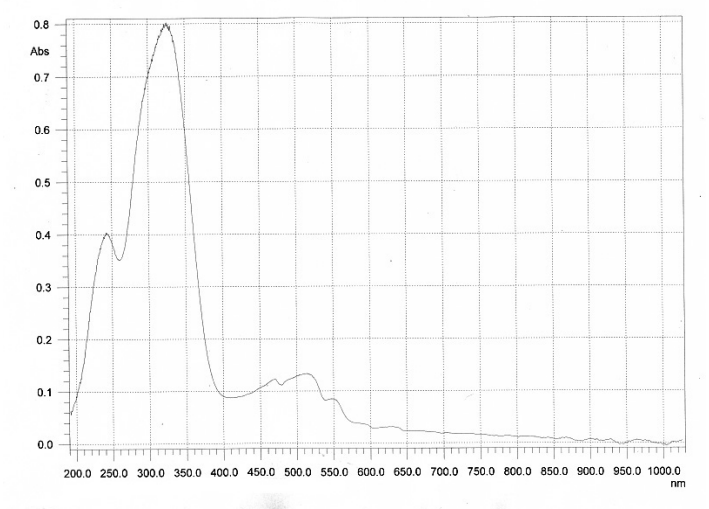


Abb. 30: UV-Vis-Spektrum Kaffeesäure, Laufhöhe 59 mm



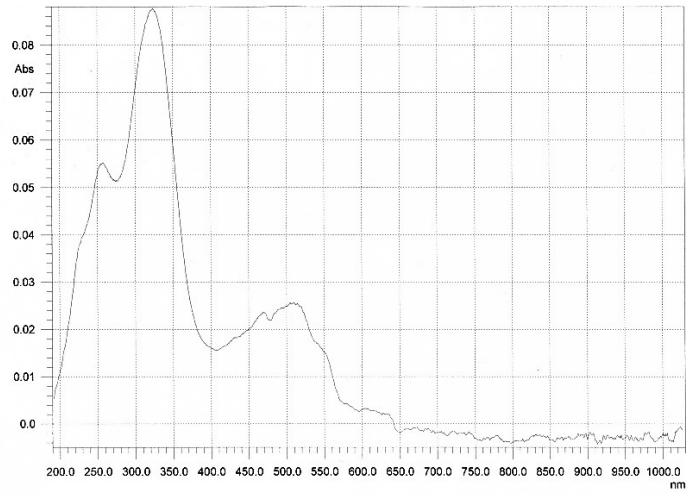


Abb. 31: UV-Vis-Spektrum Peak 9, 65 mm

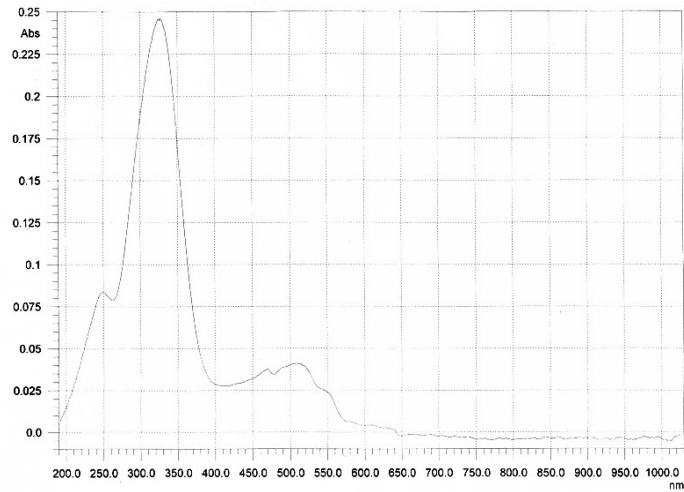


Abb. 32: UV-Vis-Spektrum Peak 10, 76 mm

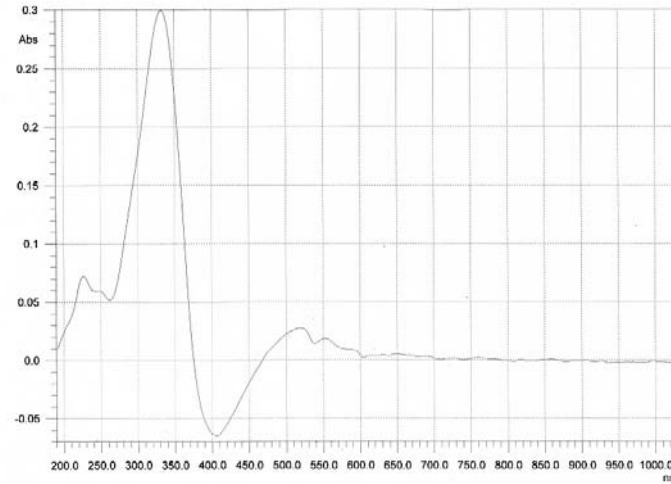


Abb. 33: UV-Vis-Spektrum Aesculin, Laufhöhe 77 mm

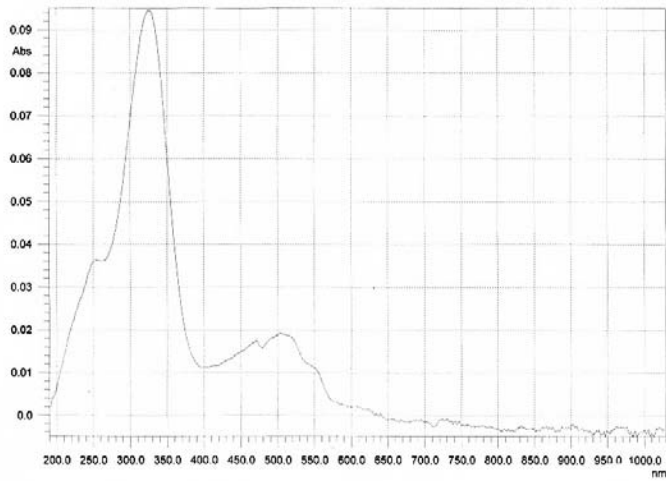


Abb. 34: UV-Vis-Spektrum Peak 11, Laufhöhe 85 mm

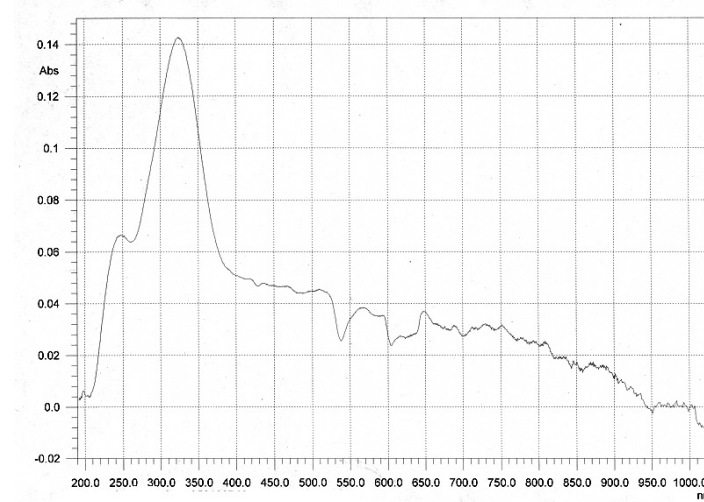


Abb. 35: UV-Vis-Spektrum Cynarin, Laufhöhe 86 mm

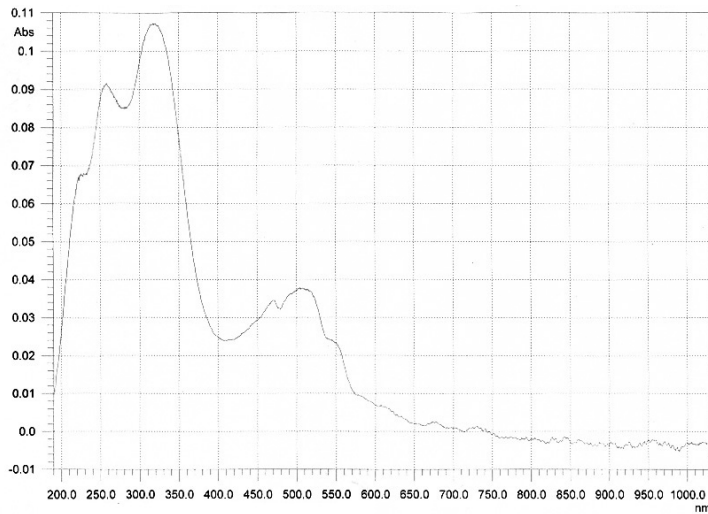


Abb. 36: UV-Vis-Spektrum Peak 12, Laufhöhe 95 mm

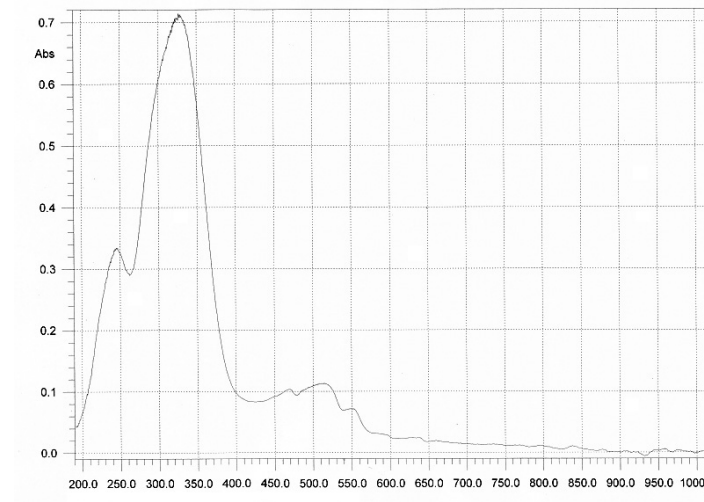
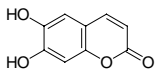
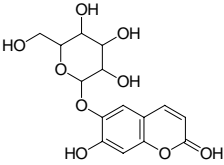
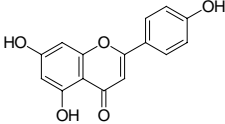


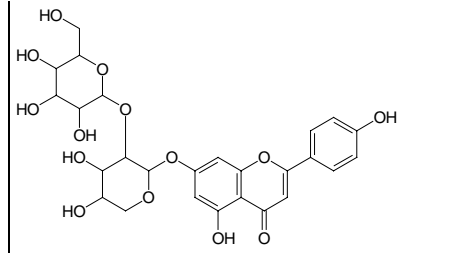
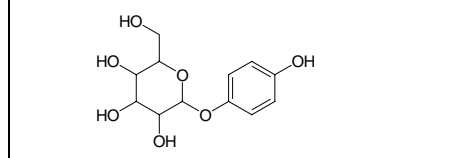
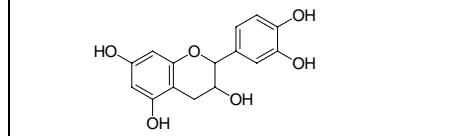
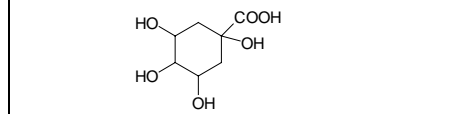
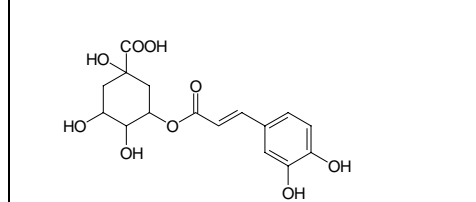
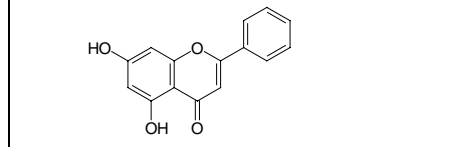
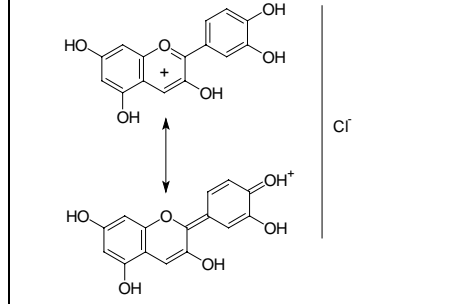
Abb. 37: UV-Vis-Spektrum Chlorogensäure, Laufhöhe 93 mm

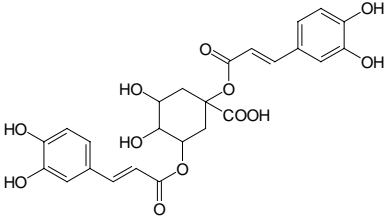
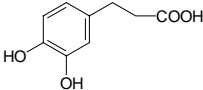
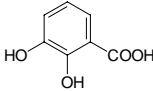
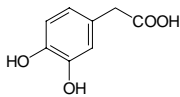
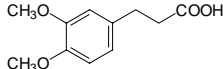
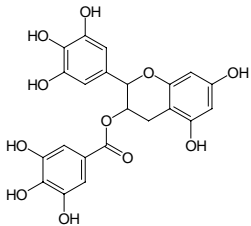
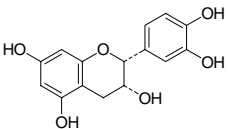
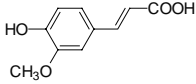
### 3.3 Screening polyphenolischer Reinstoffe

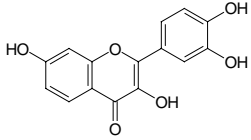
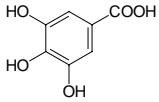
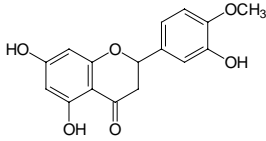
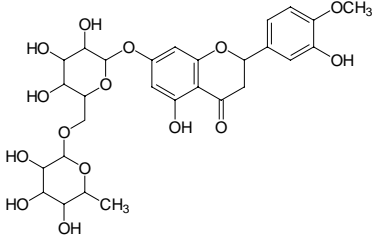
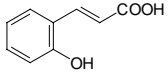
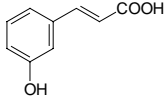
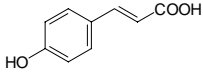
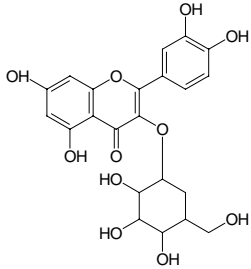
Nachdem bekannte Inhaltsstoffe in den Artischocken-Extrakten nachgewiesen worden waren, sollten diese Reinstoffe und solche mit ähnlichen Strukturen auf ihre Beeinflussung der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität untersucht werden. Dazu mussten zunächst geeignete Lösungsmittel gefunden werden für die Substanzen, die nicht in Puffer löslich waren. Um die Beeinflussung des Enzyms durch das gewählte Lösungsmittel zu kontrollieren, wurden bei allen Untersuchungen Lösungsmittel-Kontrollen mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde Acarbose eingesetzt. Die  $IC_{50}$  dieser Substanz wurde mit  $0,023 \pm 0,002$  mM bestimmt (Doppelbestimmung,  $n = 4$ ).

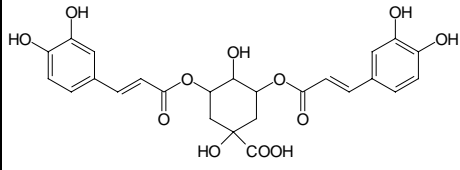
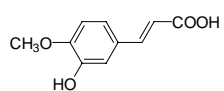
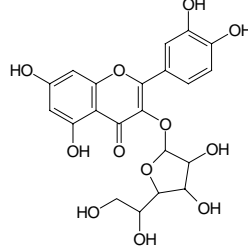
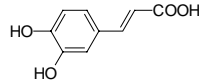
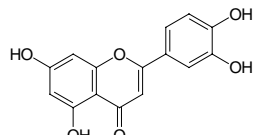
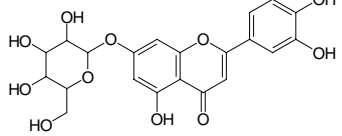
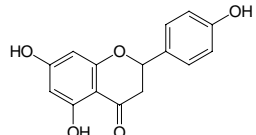
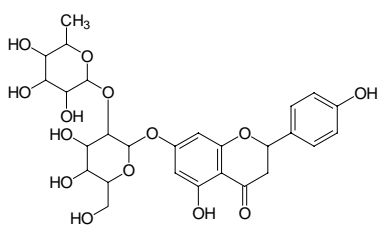
Tab. 12:  $IC_{50}$ -Konzentrationen bzw. maximal bestimmbare Hemmungen (I) der Untersuchungssubstanzen: Mittelwert  $\pm$  SD

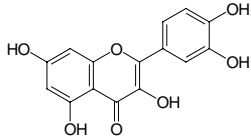
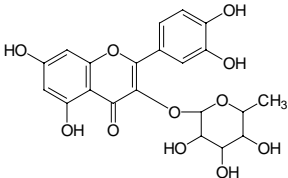
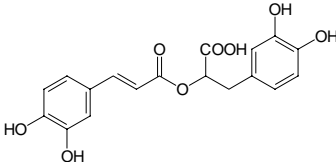
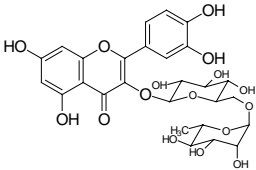
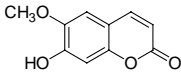
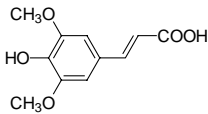
Test-substanz	Strukturformel	Lösungs-mittel	$IC_{50}$ -Konzentration	Hemmung bei maximal löslicher Konzentration
Aesculetin		Puffer		0,7 mM: I = $17,4 \pm 0,15\%$
Aesculin		Puffer	$1,67 \pm 0,02$ mM	
Apigenin		DMSO		0,2 mM: I = $12,4 \pm 0,7\%$

<p>Apigenin-7-glucosid</p>		<p>5% DMSO in Puffer</p>	<p>0,17 ± 0,005 mM</p>
<p>Arbutin</p>		<p>Puffer</p>	<p>0,9 mM : I = 30 ± 2,3%</p>
<p>(±) Catechin</p>		<p>Puffer</p>	<p>0,5 mM: I = 16 ± 1,2%</p>
<p>Chinasäure</p>		<p>Puffer</p>	<p>&gt; 13,0 mM</p>
<p>Chlorogen- säure</p>		<p>Puffer</p>	<p>1,4 ± 0,03 mM</p>
<p>Chrysin</p>		<p>10% DMSO in Puffer</p>	<p>2,0 mM: I = 5 ± 0,3%</p>
<p>Cyanidin- chlorid</p>		<p>10% DMSO in Puffer</p>	<p>1,16 mM: I = 12 ± 0,5%</p>

Cynarin		Puffer	> 2,0 mM	
Dihydro- kaffeensäure		Puffer	> 14,0 mM	
2,3- Dihydroxy- benzoesäure		Puffer	> 7,0 mM	
3,4- Dihydroxy- phenyl- essigsäure		Puffer	> 10,0 mM	
3(3,4- Dimethoxy phenyl)- propansäure		Puffer	> 12,0 mM	
Epigallo- catechin- gallat		DMSO		1,0 mM: I = 4 ± 1,2%
(-)-Epi- catechin		10% DMSO in Puffer	3,5 ± 0,04 mM	
Ferulasäure		Puffer	> 5,0 mM	

Fisetin		5% DMSO in Puffer	0,44 ± 0,005 mM	
Gallussäure		Puffer	2,35 ± 0,064 mM	
Hesperetin		DMSO		1,65 mM: I = 30 ± 1,2%
Hesperidin		DMSO		0,41 mM: I = 8 ± 0,6%
2-Hydroxy- zimtsäure		Puffer	> 9,0 mM	
3-Hydroxy- zimtsäure		Puffer	> 9,0 mM	
4-Hydroxy- zimtsäure		Puffer	> 9,0 mM	
Hyperosid		Puffer		0,27 mM: I = 5 ± 0,3%

<p>“Isochlorogensäure”</p>	 <p>Beispiel: <i>Isochlorogensäure A</i></p>	<p>Puffer</p>	<p>0,39 ± 0,027 mM</p>	
<p>Isoferulasäure</p>		<p>Puffer</p>	<p>&gt; 7,0 mM</p>	
<p>Isoquercitrin</p>		<p>Puffer</p>		<p>1,08 mM: I = 12,2 ± 1,3%</p>
<p>Kaffeesäure</p>		<p>Puffer</p>	<p>4,8 ± 0,019 mM</p>	
<p>Luteolin</p>		<p>DMSO</p>	<p>0,17 ± 0,026 mM</p>	
<p>Luteolin-7-glucosid</p>		<p>5% DMSO in Puffer</p>	<p>0,28 ± 0,002 mM</p>	
<p>Naringenin</p>		<p>10% DMSO in Puffer</p>	<p>1,8 ± 0,012 mM</p>	
<p>Naringin</p>		<p>10% DMSO in Puffer</p>		<p>1 mM: I = 0</p>

Quercetin		5% DMSO in Puffer		0,5 mM: I = 11,2 ± 1%
Quercitrin		5% DMSO in Puffer		0,56 mM: I = 37,6 ± 1,2%
Rosmarin- säure		Puffer	1,4 ± 0,008 mM	
Rutin		DMSO		0,75 mM: I = 20,1 ± 2%
Scopoletin		Puffer	1,3 ± 0,05 mM	
Sinapin- säure		Puffer	> 6,5	
Tannin		Puffer	0,14 ± 0,01 mM	

Für die Untersuchung der Reinstoffe wurden Stammlösungen von 1 mg/ml bzw. 2 mg/ml hergestellt, die zum Testen verwendet worden sind. Stellte sich dabei heraus, dass die  $IC_{50}$  deutlich über 5 mM lag, wurde die Substanz nicht näher untersucht. Ein Problem stellte sich durch die Löslichkeit mancher Substanzen. Waren sie nicht in Puffer löslich, wurden DMSO-Stammlösungen hergestellt und mit Puffer auf DMSO-Konzentrationen verdünnt, die die Aktivität des Enzyms nicht beeinflussten. DMSO-Kontrollen in entsprechenden Konzentrationen wurden mitgeführt. Durch den Pufferzusatz ließen sich einige der



Untersuchungssubstanzen in höheren Konzentrationen nicht in Lösung halten, so dass eine Bestimmung der IC<sub>50</sub> nicht möglich war. Stattdessen wurde die Hemmung der maximal löslichen Konzentration bestimmt.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine Kombination der Reinstoffe einen stärkeren Effekt bewirkt als die einzelnen Komponenten. Dazu wurden 4 mM Stammlösungen von Chlorogensäure und Isochlorogensäure im Verhältnis 1:1 gemischt und als Kombinationslösung in Volumina von 10/25/50/75/100 µl getestet.

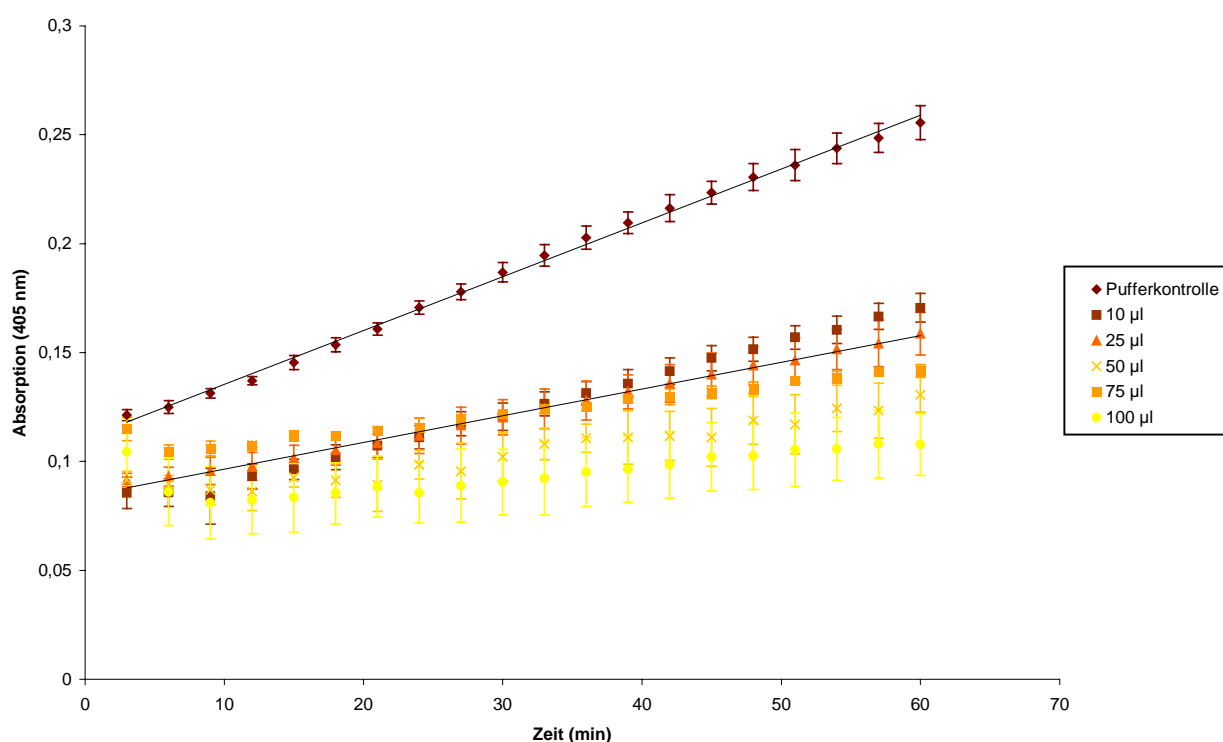


Abb. 38: Testung von Chlorogensäure und Isochlorogensäure in Kombination (1:1, je 4 mM); n ≥ 4, Darstellung der Mittelwerte ± SD

	Anstieg der Geraden	Aktivität in %	Hemmung in %
Pufferkontrolle	0,0025	100	0
10 µl	0,0016	64	36
25 µl	0,0012	48	52
50 µl	0,0008	32	68
75 µl	0,0007	28	72
100 µl	0,0004	16	84

Es zeigte sich, dass bereits bei einem eingesetzten Testvolumen von 25 µl entsprechend einer Konzentration von jeweils 0,25 mM der Substanzen das Enzym zu 50% gehemmt war. Die IC<sub>50</sub>-Werte der Einzelkomponenten lagen bei 0,39 ± 0,027 mM (Isochlorogensäure) bzw. 1,4 ± 0,03 mM (Chlorogensäure).

Bei der Untersuchung der Pflanzenextrakte wurden teilweise auch Presssäfte verwendet. Da

bei manchen Extrakten und gerade bei den Presssäften der Früchte davon auszugehen ist, dass freie Zucker im Extrakt gelöst waren, wurden exemplarisch verschiedene Zucker auf ihren Einfluss auf die  $\alpha$ -Amylase-Aktivität untersucht. Dazu wurden Lösungen (100 mg/ml) verschiedener Zucker in Puffer hergestellt. Jeweils 10/50/100  $\mu$ l wurden zum Testen eingesetzt. Dabei zeigten Lösungen von Fucose, Rhamnose, Galaktose, Glukose, Fructose und Lactose keine messbare Beeinflussung der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität. Dagegen bewirkten Lösungen von Saccharose und Maltose eine deutliche Beeinflussung des Enzyms. Während die Hemmung des Substratabbaus durch 100  $\mu$ l der Saccharoselösung bei  $17,6 \pm 1,3\%$  liegt, wird die Abspaltung des messbaren p-Nitrophenols durch 100  $\mu$ l der Maltoselösung zu  $80 \pm 2,3\%$  gehemmt. Es scheint so, als würden diese Disaccharide mit dem Substrat um den Abbau konkurrieren.

Es wurde untersucht, welchen Einfluss Maltose auf die  $\alpha$ -Amylase Aktivität ausübt. Dazu wurden Maltose-Puffer-Stammlösungen mit jeweils 5/25/50/75/100 mg/ml hergestellt, von denen jeweils 50  $\mu$ l zu Testzwecken eingesetzt wurden. Die erzielten Hemmungen sind in Abbildung 39 dargestellt.

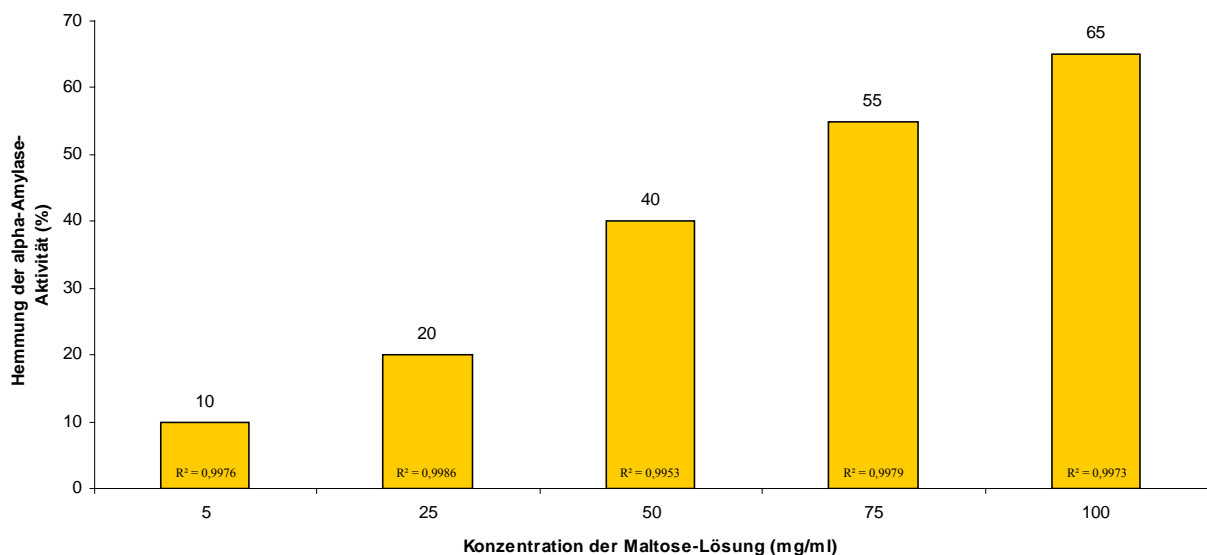


Abb. 39: Hemmung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität durch Maltose, Werte über lineare Regressionsanalyse ( $R^2$  = Linearitätskoeffizient)

Nun sollte überprüft werden, wie sich eine Kombination aus Isochlorogensäure und Maltose hinsichtlich der Beeinflussung der Enzymaktivität verhält. Dazu wurde den oben eingesetzten Maltose-Stammlösungen eine Isochlorogensäurelösung in der  $IC_{50}$ -Konzentration zugesetzt.

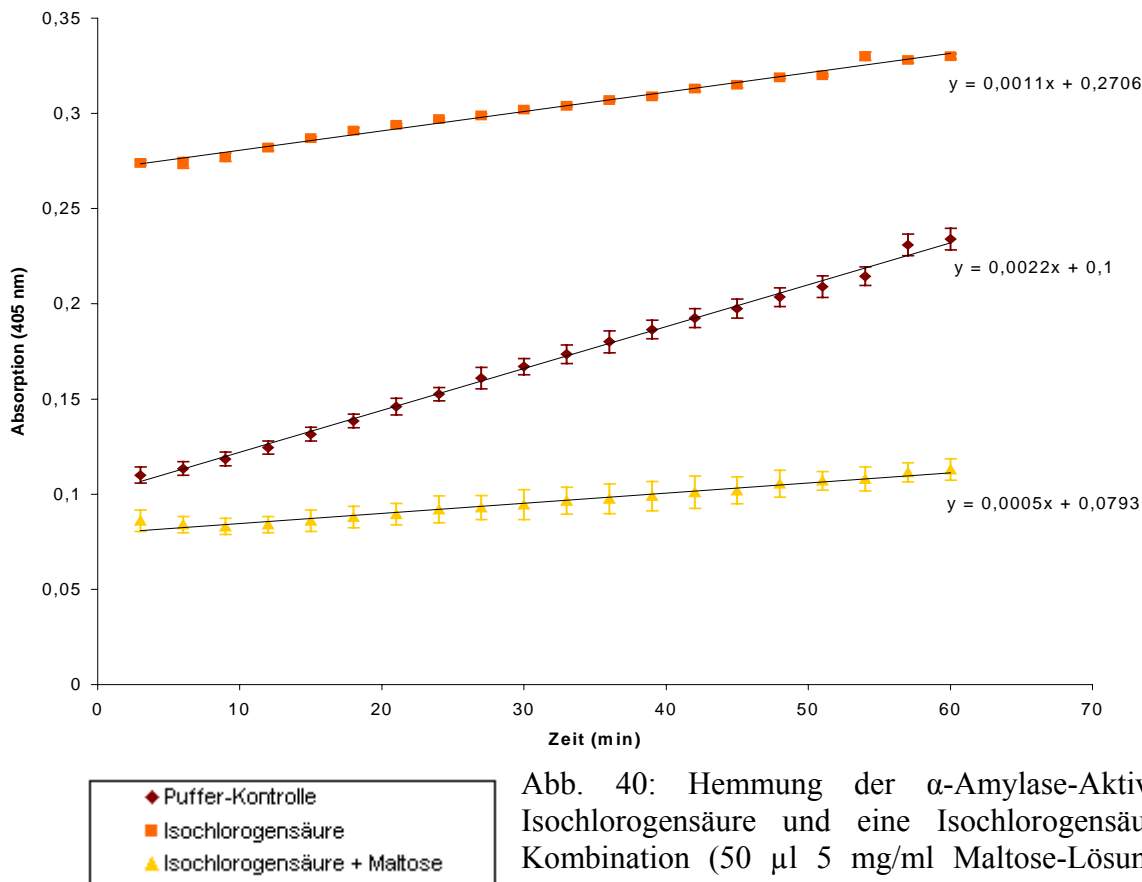


Abb. 40: Hemmung der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität durch Isochlorogensäure und eine Isochlorogensäure-Maltose-Kombination (50  $\mu$ l 5 mg/ml Maltose-Lösung);  $n \geq 4$ , Mittelwerte  $\pm$  SD

Dabei zeigte sich, dass Maltose in Kombination mit Isochlorogensäure zu einem deutlich verringerten Substratabbau führte. Während die getestete Maltoselösung in einer Konzentration von 5 mg/ml zu einem um 10% verringerten Abbau des Substrates führten, bewirkte die Kombination mit Isochlorogensäure in der  $IC_{50}$ -Konzentration einen um fast 80% gehemmten Substratabbau.

### 3.4 Enzym-Match-Untersuchungen

Die Untersuchungen zu möglichen Angriffspunkten potentieller Enzyminhibitoren am Amylase-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  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren sein könnte.

Als Modell-Testsubstanz wurde Chlorogensäure ausgewählt. Diese zeigte im in vitro-Test ein ausgeprägtes Potential, die  $\alpha$ -Amylase zu hemmen. Der CA Index gibt zwei ähnliche Strukturen an, die sich lediglich durch Konfiguration der OH-Gruppe an Position 4 des Cyclohexanrestes unterscheiden. Denkbar ist, dass durch Hydrolyse beide Formen aus den Dicafeoylchinasäureestern freigesetzt werden und es sich hier um die eigentlich hemmenden Komponenten handelt.

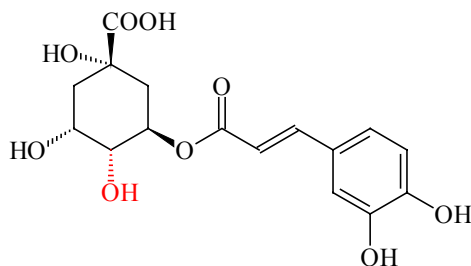


Abb. 41: Chlorogensäure

(1S,3R,4R,5R)-3-[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-prop-2-enyloxy]-1,4,5-trihydroxy-cyclohexan-1-carbonsäure

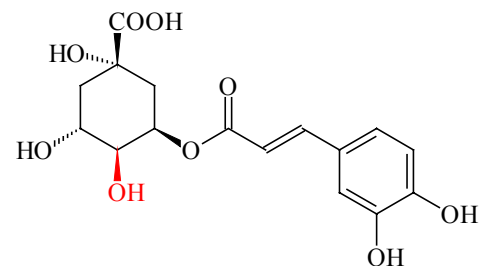


Abb. 42: Isochlorogensäure

(1S,3R,4S,5R)-3-[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-prop-2-enyloxy]-1,4,5-trihydroxy-cyclohexan-1-carbonsäure

Wegen der strukturellen Ähnlichkeit wurde die Möglichkeit des Angriffs in der Disaccharidbindungsstelle untersucht.

Vergleicht man Chlorogensäure und Isochlorogensäure innerhalb der Disaccharidbindungsstelle, fällt auf, dass die OH-Gruppe in Position 4 in der Chlorogensäure eine sterische Behinderung innerhalb des Grundgerüsts bewirkt. Diese Behinderung bleibt bei der Isochlorogensäure aus.

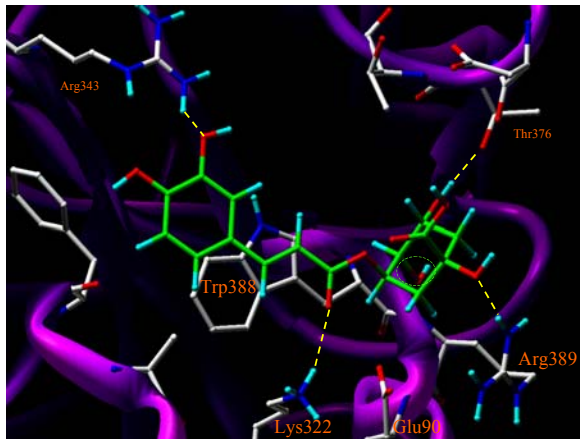


Abb. 43: Chlorogensäure (Wannenkonfiguration) in der Disaccharidbindungsstelle

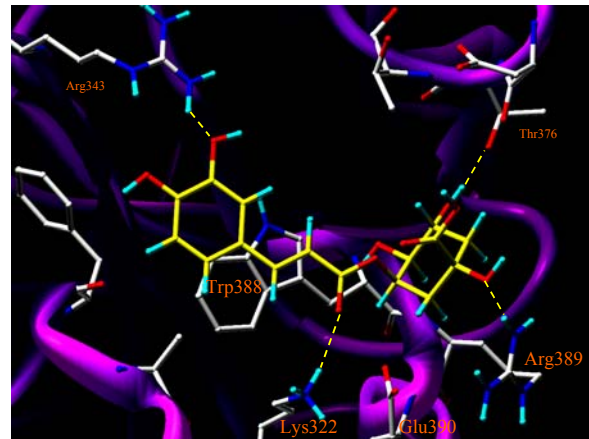


Abb. 44: Isochlorogensäure (Wannenkonfiguration) in der Disaccharidbindungsstelle

(Abbildungen von Dr. G. Krause, FMP, Berlin)

Bei Vorliegen der Isochlorogensäure in der Sesselkonfiguration könnten mehr Wasserstoffbrückenbindungen zum Enzym geschlossen werden als in der Wannenkonfiguration. Zusätzlich könnte es zu Wechselwirkungen der Säuregruppe mit Arg389 kommen. Des Weiteren ist eine Wasserstoffbrücke der OH Gruppe an C4 zu Trp376 denkbar, wohingegen das R-Enantiomer, also Chlorogensäure, an dieser Stelle eine sterische Behinderung mit dem Enzymgerüst bewirken würde.

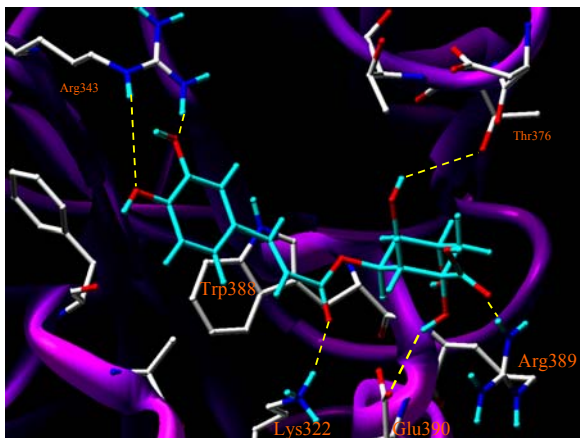


Abb. 45: Isochlorogensäure (Sesselkonfiguration) in der Disaccharidbindungsstelle

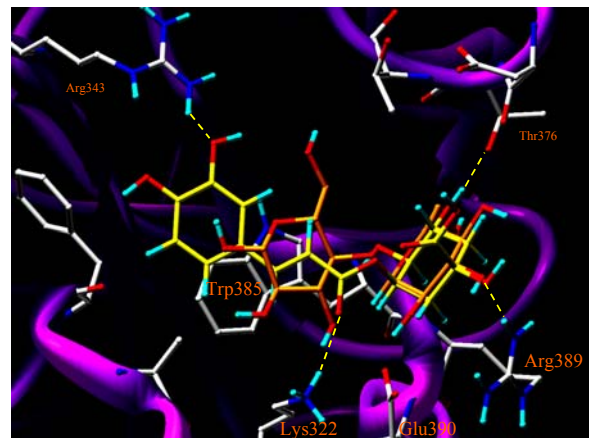


Abb. 46: Übereinanderlegen von Maltose (orange) und Isochlorogensäure jeweils in Wannenkonfiguration

(Abbildungen von Dr. G. Krause, FMP, Berlin)

### 3.5 Blutzuckeruntersuchungen

Die im Screening gezeigten Resultate sollten durch *in vivo* Versuche an vier gesunden Probanden bestätigt werden. Die Untersuchungen erfolgten wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben.

Die Darstellungen der Blutzuckerkurven bzw. der Differenzen zwischen Nüchternblutzucker und Blutzuckerspitze zeigen die Mittelwerte von jeweils 3 – 6 unabhängigen Experimenten. Als Streuungsmaß wurde die Spannweite (Range, R) verwendet. Die Prüfung auf Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte erfolgte mittels Mann-und-Whitney-Test,  $\alpha = 5\%$ .

Proband 1: ♂, 50 Jahre

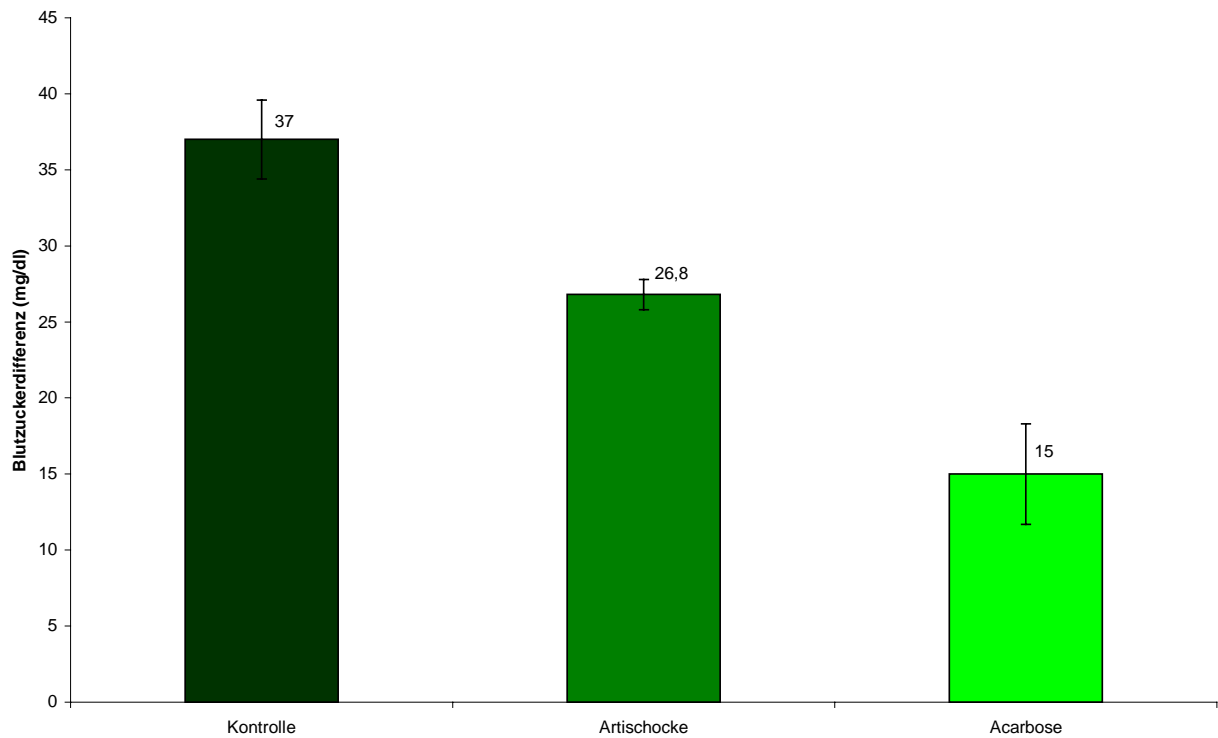


Abb. 47: Differenzen zwischen Nüchternblutzucker und Blutzuckerspitze ( $n \geq 3$ , Mittelwert  $\pm$  R)

Proband 2: ♀, 56 Jahre

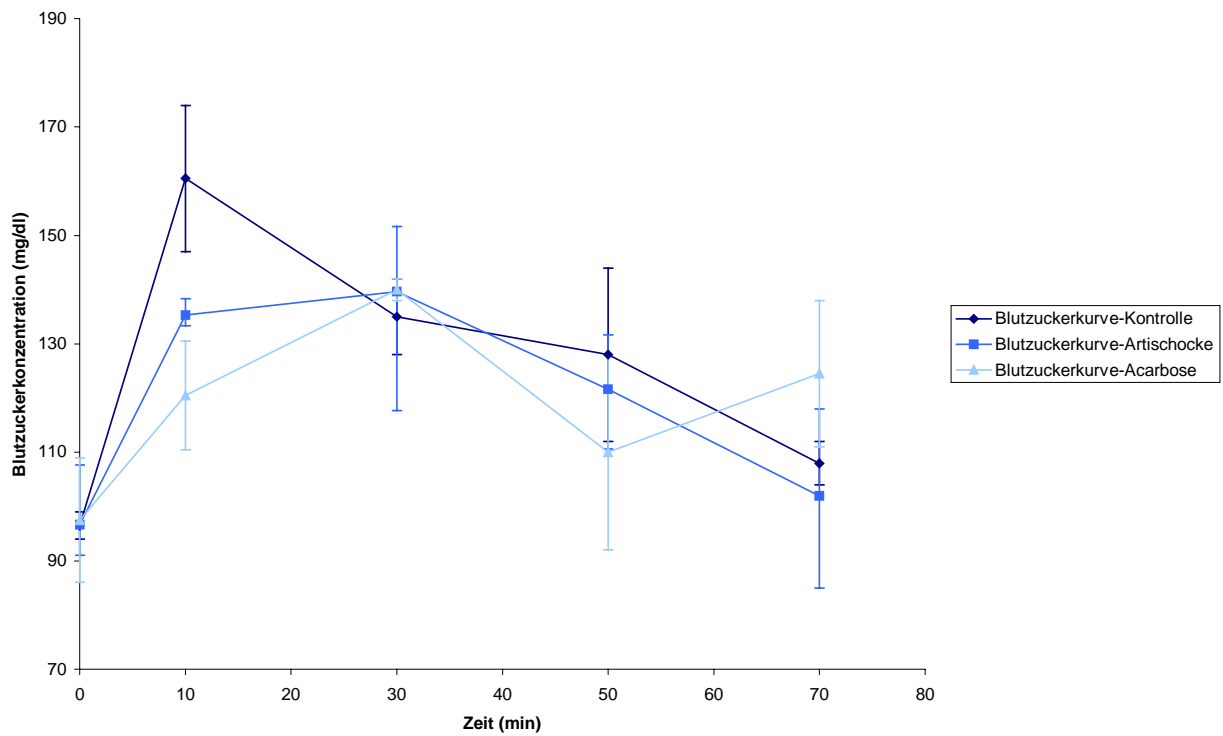


Abb. 48: Blutzuckerkurven Proband 2 (n ≥ 3, Mittelwert ± R)

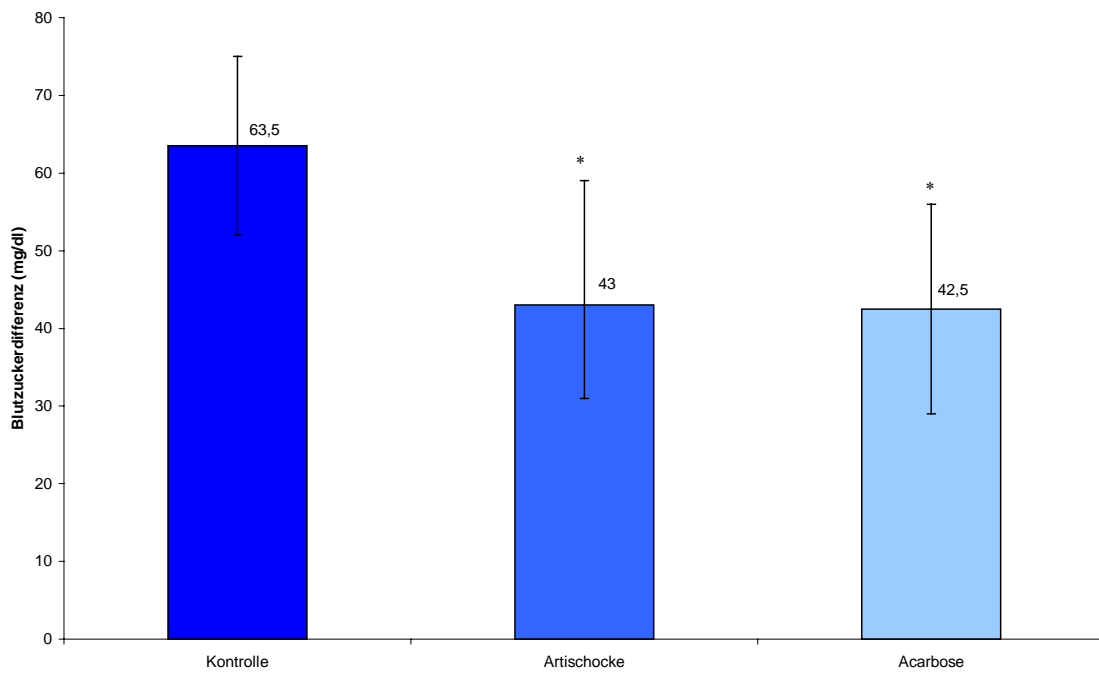


Abb. 49: Differenzen zwischen Nüchternblutzucker und Blutzuckerspitze (n ≥ 3, Mittelwert ± R, \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle, α =5%)

Proband 3: ♀, 29 Jahre

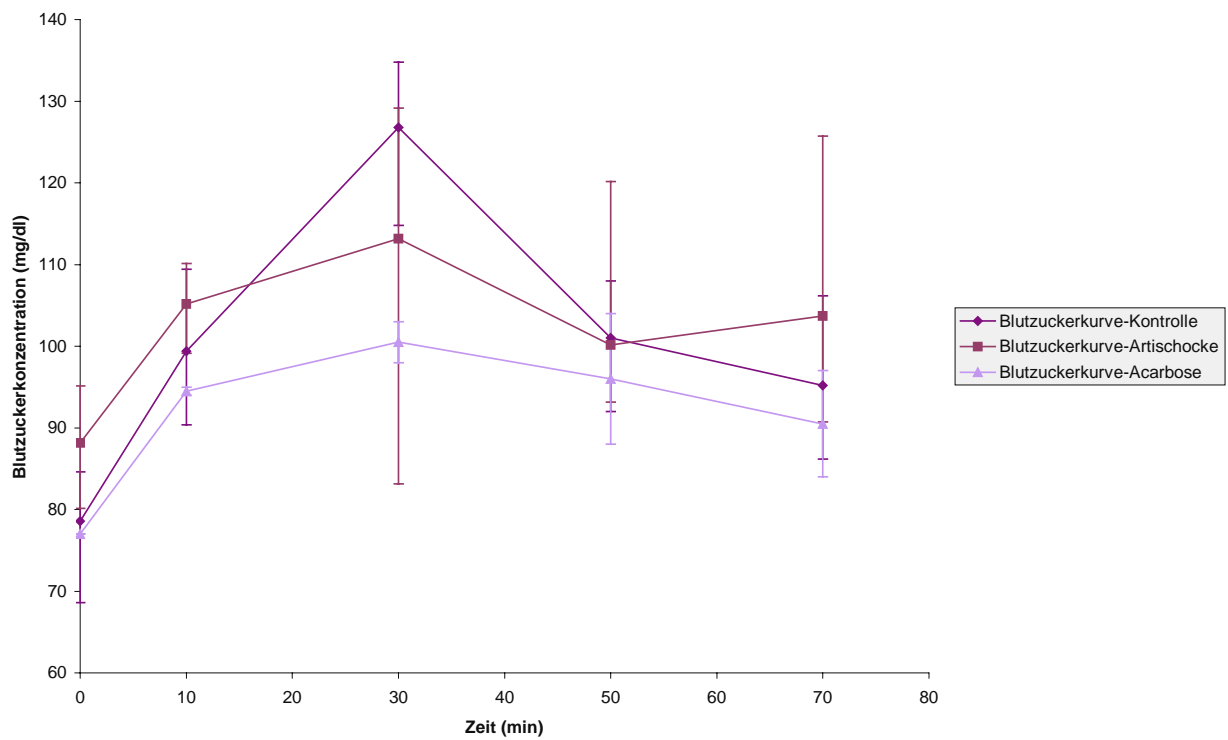


Abb. 50: Blutzuckerkurven Proband 3 (n ≥ 3, Mittelwert ± R)

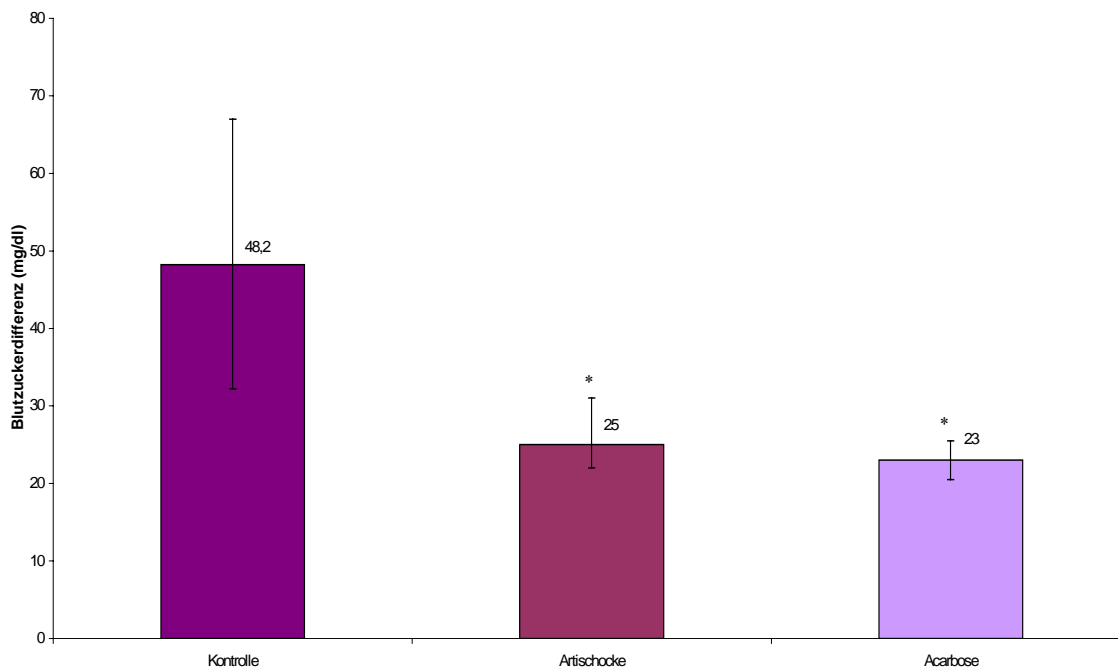


Abb. 51: Differenzen zwischen Nüchternblutzucker und Blutzuckerspitze (n ≥ 3, Mittelwert ± R, \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle, α =5%)



Proband 4: ♀, 44 Jahre

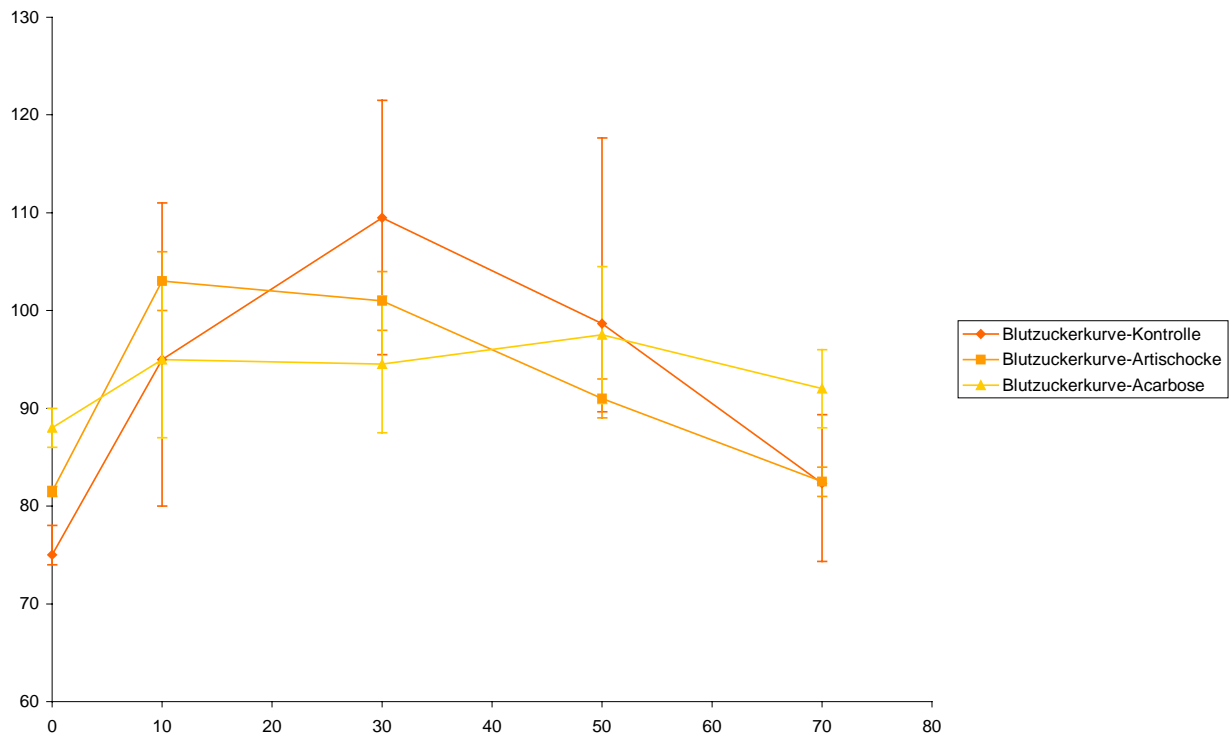


Abb. 52: Blutzuckerkurven Proband 4 (n ≥ 3, Mittelwert ± R)

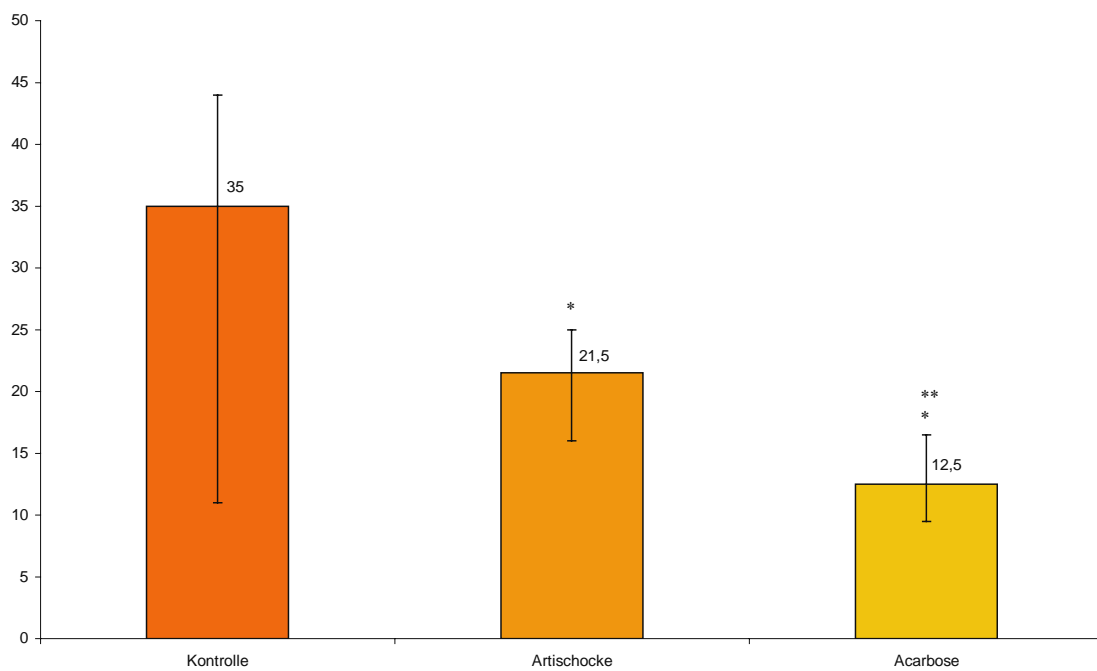


Abb. 53: Differenzen zwischen Nüchternblutzucker und Blutzuckerspitze (n ≥ 3, Mittelwert ± R, \* signifikanter Unterschied zur Kontrolle, \*\* signifikanter Unterschied zu Artischocke, α = 5%)

Tab.13: durchschnittliche Senkung der postprandialen Blutzuckerspitze

	nach Einnahme von 200 mg Königsartischockenextrakt	nach Einnahme von 50 mg Acarbose
Proband 1	27,6 ± 3,4%	59,5 ± 4%
Proband 2	32,3 ± 8,5%	33,1 ± 10,5%
Proband 3	48,1 ± 8,4%	52,3 ± 5,7%
Proband 4	38,6 ± 10%	64,3 ± 8,6%
<b><i>Durchschnitt</i></b>	<b>36,7%</b>	<b>52,3%</b>

Um zu überprüfen, ob der untersuchte Extrakt eine hypoglykämische Wirkung hat, wurde zusätzlich der Blutzuckerlauf ohne Nahrungsaufnahme beobachtet. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Einnahme des Extraktes keine hypoglykämische Reaktion bewirkte.